

PCT

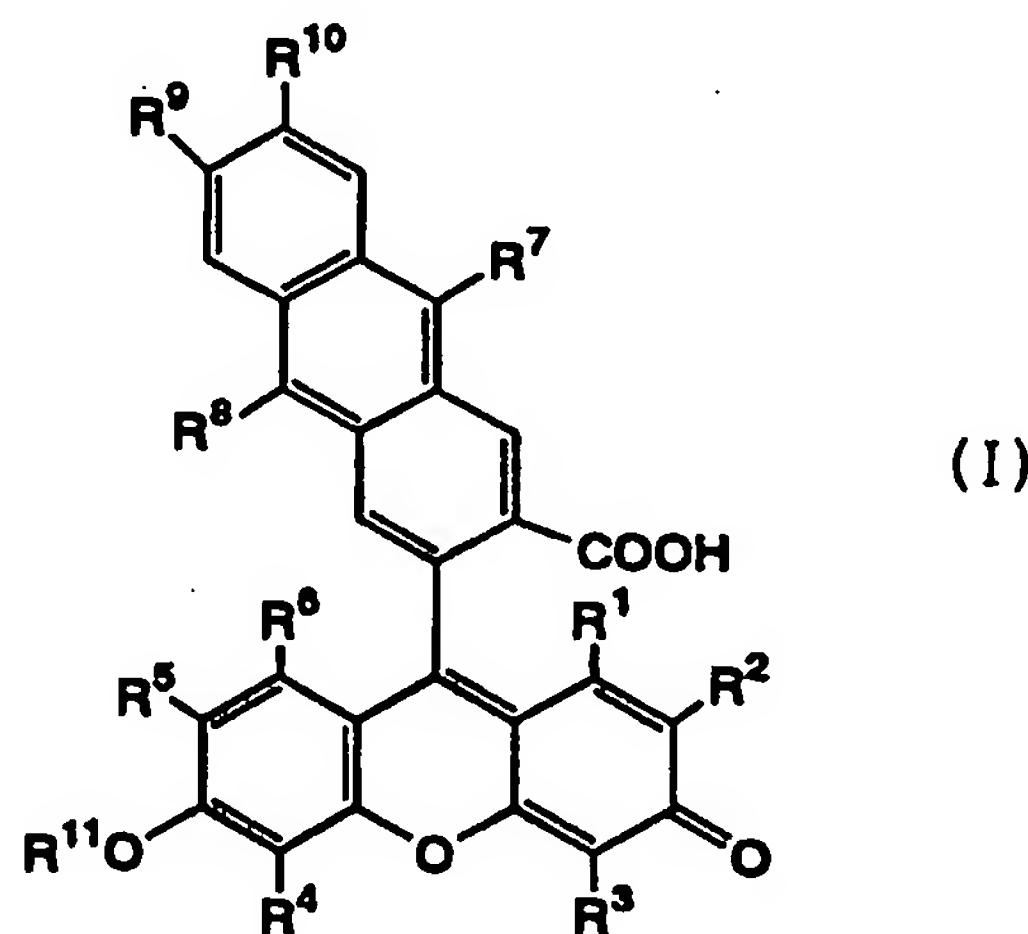
世界知的所有権機関
国際事務局
特許協力条約に基づいて公開された国際出願



(51) 国際特許分類6 C07D 311/82, 493/08, 493/10, 493/22, G01N 33/48, 21/78	A1	(11) 国際公開番号 WO99/51586
		(43) 国際公開日 1999年10月14日(14.10.99)
(21) 国際出願番号 PCT/JP99/01658		
(22) 国際出願日 1999年3月31日(31.03.99)		
(30) 優先権データ 特願平10/86086 1998年3月31日(31.03.98)	JP	(81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)
(71) 出願人 ; および (72) 発明者 長野哲雄(NAGANO, Tetsuo)[JP/JP] 〒167-0032 東京都杉並区天沼1-28-15 Tokyo, (JP)		添付公開書類 国際調査報告書
(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 梅澤直樹(UMEZAWA, Naoki)[JP/JP] 〒157-0066 東京都世田谷区成城2-36-8-409 Tokyo, (JP)		
(74) 代理人 今村正純, 外(IMAMURA, Masazumi et al.) 〒104-0031 東京都中央区京橋一丁目5番5号 KRFビル5階 Tokyo, (JP)		

(54) Title: REAGENT FOR SINGLET OXYGEN DETERMINATION

(54) 発明の名称 一重項酸素測定用試薬

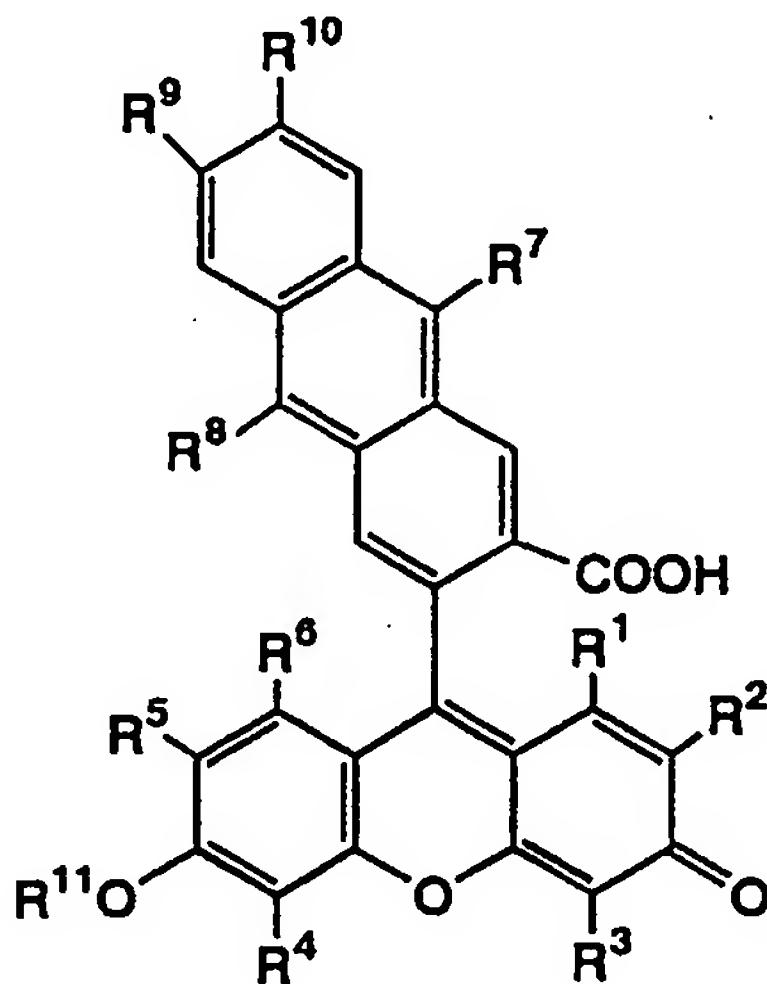


(57) Abstract

Compounds represented by general formula (I) or salts thereof, wherein R¹, R², R³, R⁴, R⁵, and R⁶ each independently represents hydrogen, halogeno, C₁₋₆ alkyl, or C₁₋₆ alkoxy; R⁷ and R⁸ each independently represents C₁₋₆ alkyl or optionally substituted aryl; R⁹ and R¹⁰ each independently represents hydrogen, C₁₋₆ alkyl, or C₁₋₆ alkoxy; and R¹¹ represents hydrogen or C₁₋₁₂ alkanoyl. The compounds are substantially nonfluorescent and react with singlet oxygen under physiological conditions to give a fluorescent substance. They are hence useful as a reagent for singlet oxygen determination.

(57)要約

下記の一般式(I)：



(式中、R¹、R²、R³、R⁴、R⁵、及びR⁶はそれぞれ独立に水素原子、ハロゲン原子、C₁₋₆アルキル基、又はC₁₋₆アルコキシル基を示し、R⁷及びR⁸はそれぞれ独立にC₁₋₆アルキル基又は置換基を有することもあるアリール基を示し、R⁹及びR¹⁰はそれぞれ独立に水素原子、C₁₋₆アルキル基、又はC₁₋₆アルコキシル基を示し、R¹¹は水素原子又はC₁₋₁₂アルカノイル基を示す)で表される化合物又はその塩。上記化合物は実質的に非蛍光性であり、一重項酸素と生理的条件下で反応して蛍光性物質を与えるので、一重項酸素測定用試薬として有用である。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦	DM ドミニカ	KZ カザフスタン	RU ロシア
AL アルバニア	EE エストニア	LC セントルシア	SD スーダン
AM アルメニア	ES スペイン	LK リヒテンシュタイン	SE スウェーデン
AT オーストリア	FI フィンランド	LR スリ・ランカ	SG シンガポール
AU オーストラリア	FR フランス	LS リベリア	SI スロヴェニア
AZ アゼルバイジャン	GA ガボン	LT リトアニア	SK スロ伐キア
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB 英国	LU ルクセンブルグ	SL シエラ・レオネ
BB バルバドス	GD グレナダ	LV ラトヴィア	SN セネガル
BE ベルギー	GE グルジア	MA モロッコ	SZ スウェーデン
BF ブルガニア・ファソ	GH ガーナ	MC モナコ	TD チャード
BG ブルガリア	GM ガンビア	MD モルドヴァ	TG トーゴー
BJ ベナン	GN ギニア	MG マダガスカル	TJ タジキスタン
BR ブラジル	GW ギニア・ビサオ	MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TZ タンザニア
BY ベラルーシ	GR ギリシャ	共和国	TM トルクメニスタン
CA カナダ	HR クロアチア	ML マリ	TR トルコ
CF 中央アフリカ	HU ハンガリー	MN モンゴル	TT トリニダッド・トバゴ
CG コンゴー	ID インドネシア	MR モーリタニア	UA ウクライナ
CH スイス	IE アイルランド	MW マラウイ	UG ウガンダ
CI コートジボアール	IL イスラエル	MX メキシコ	US 米国
CM カメルーン	IN インド	NE ニジェール	UZ ウズベキスタン
CN 中国	IS アイスランド	NL オランダ	VN ヴィエトナム
CR コスタ・リカ	IT イタリア	NO ノルウェー	YU ユーゴースラビア
CL キューバ	JP 日本	NZ ニュー・ジーランド	ZA 南アフリカ共和国
CY キプロス	KE ケニア	PL ポーランド	ZW ジンバブエ
CZ チェコ	KG キルギスタン	PT ポルトガル	
DE ドイツ	KP 北朝鮮	RO ルーマニア	
DK デンマーク	KR 韓国		

明細書

一重項酸素測定用試薬

技術分野

本発明は、一重項酸素測定用試薬として有用な化合物又はその塩に関するものである。また、本発明は上記化合物又はその塩を含む一重項酸素測定用試薬に関する。

背景技術

生体および生命現象において一酸化窒素などのフリーラジカル種が情報伝達のセカンドメッセンジャーとして作用しており、循環器系などにおいて血圧の制御を行うなど多様な生理作用を発揮していることが知られている。また、活性酸素のスーパーオキシドや過酸化水素も免疫系などにおいて重要な生理作用を発揮していることも明らかにされている。これらに対して、類似の電子構造を有する一重項酸素については生理活性種としての重要性は従来ほとんど解明されていなかった。

最近、癌治療法の一つであるフォトダイナミック・セラピー (Photodynamic therapy) における反応種が一重項酸素であることが明らかにされ、また、生体内で各種の酸化酵素、ペルオキシダーゼなどが一重項酸素を生成していることが示唆されている。さらに、生体において酸素分子がセンサーとして作用し、シグナル様の働きをすることも明らかにされており、一重項酸素も生体内で重要な生理作用を担っている可能性が示唆されている。

従来、生体内の一重項酸素を測定する方法として、化学発光法、電子スピン共鳴 (ESR) 法、発光法など十数種が知られているが、いずれも特異性及び感度が低く、信頼のおける方法とはいえない (一重項酸素の特異的検出法については Nagano, T., et al., Free radicals in Clinical Medicine, Vol. 7, pp. 35-41, 1993

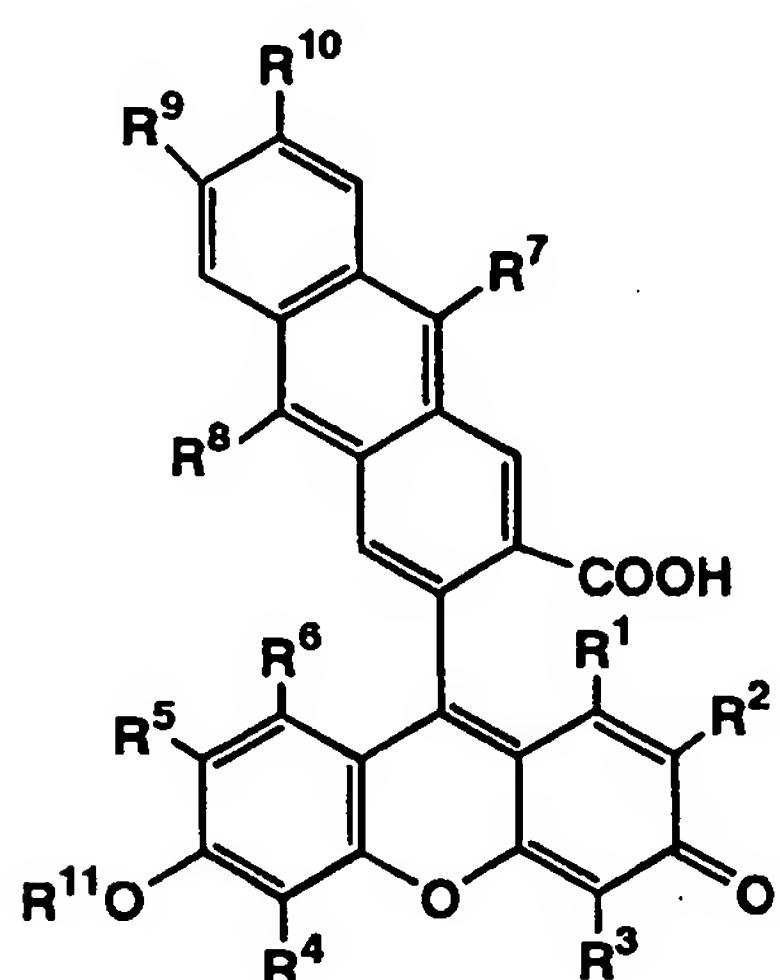
などを参照のこと)。従って、一重項酸素の生命現象への関与を研究するために、特異性及び感度に優れた測定方法の開発が望まれている。

発明の開示

本発明の課題は、一重項酸素の測定用試薬として有用な化合物を提供することにある。また、本発明の別な課題は、上記化合物を含む一重項酸素測定用試薬及び上記化合物を用いた一重項酸素の測定方法を提供することにある。特に、生体内の特定の細胞や組織中に局在する一重項酸素をバイオイメージングの手法によって正確に測定するための試薬を提供することが本発明の課題である。

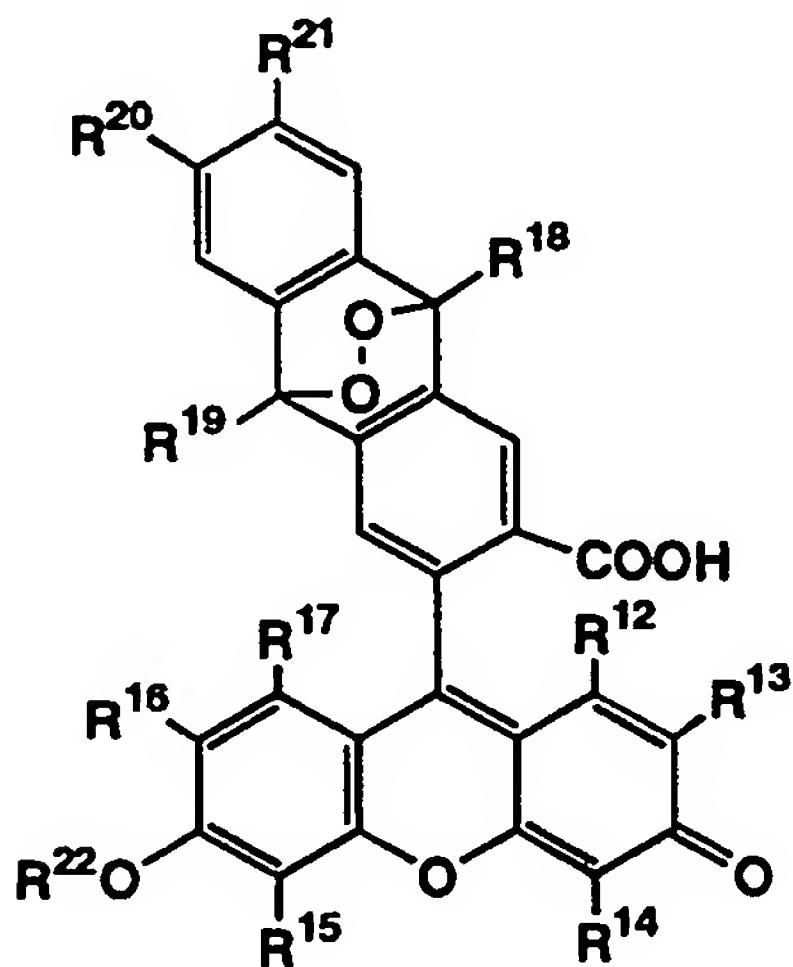
本発明者らは上記の課題を解決すべく鋭意努力した結果、下記の一般式(I)で表される実質的に非蛍光性の化合物が一重項酸素と効率的に反応して、一般式(II)で表される蛍光性の化合物を与えること、並びに一般式(I)で表される化合物を一重項測定用試薬として用い、生細胞や生体組織中に局在する一重項酸素と反応して生成する一般式(II)の化合物の蛍光を測定すると、極めて特異的かつ高感度に一重項酸素を測定できることを見出した。本発明はこれらの知見を基にして完成されたものである。

すなわち本発明は、下記の一般式(I)：



(式中、R¹、R²、R³、R⁴、R⁵、及びR⁶はそれぞれ独立に水素原子、ハロゲン原子、C₁₋₆アルキル基、又はC₁₋₆アルコキシル基を示し、R⁷及びR⁸はそれぞれ独立にC₁₋₆アルキル基又は置換基を有することもあるアリール基を示し、R⁹及びR¹⁰はそれぞれ独立に水素原子、C₁₋₆アルキル基、又はC₁₋₆アルコキシル基を示し、R¹¹は水素原子又はC₁₋₁₂アルカノイル基を示す)で表される化合物又はその塩を提供するものである。

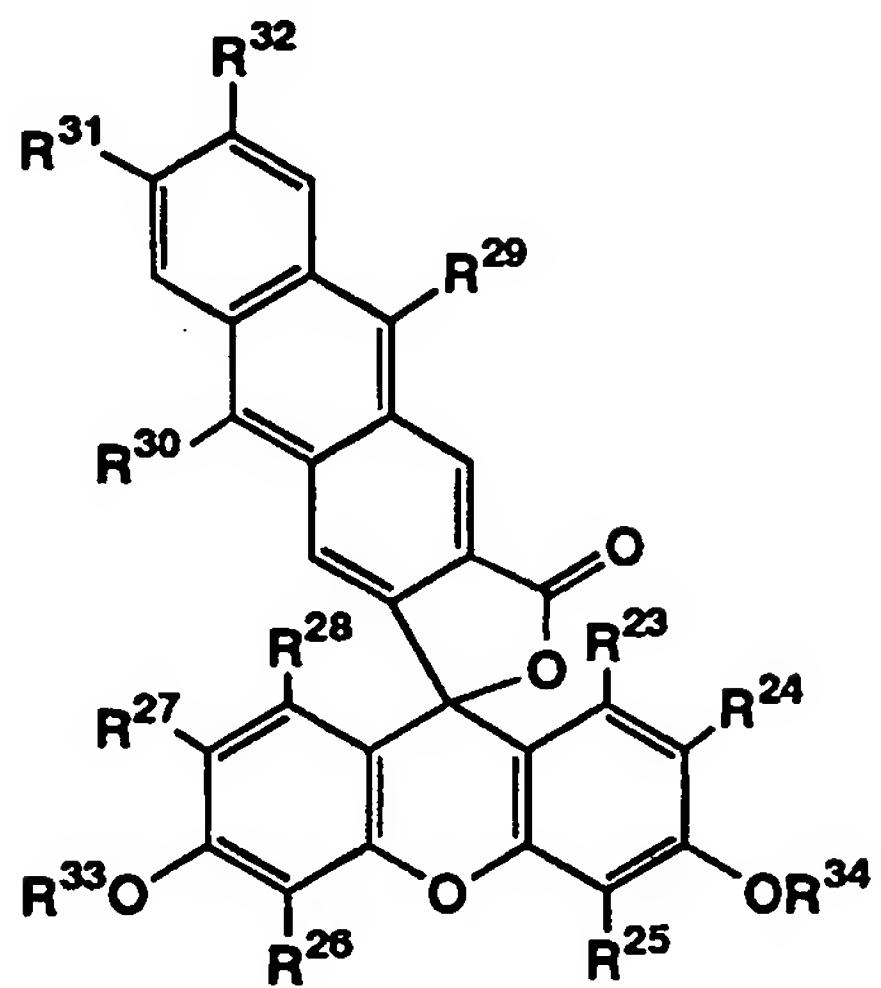
また、別の観点からは、本発明により下記の一般式(II)：



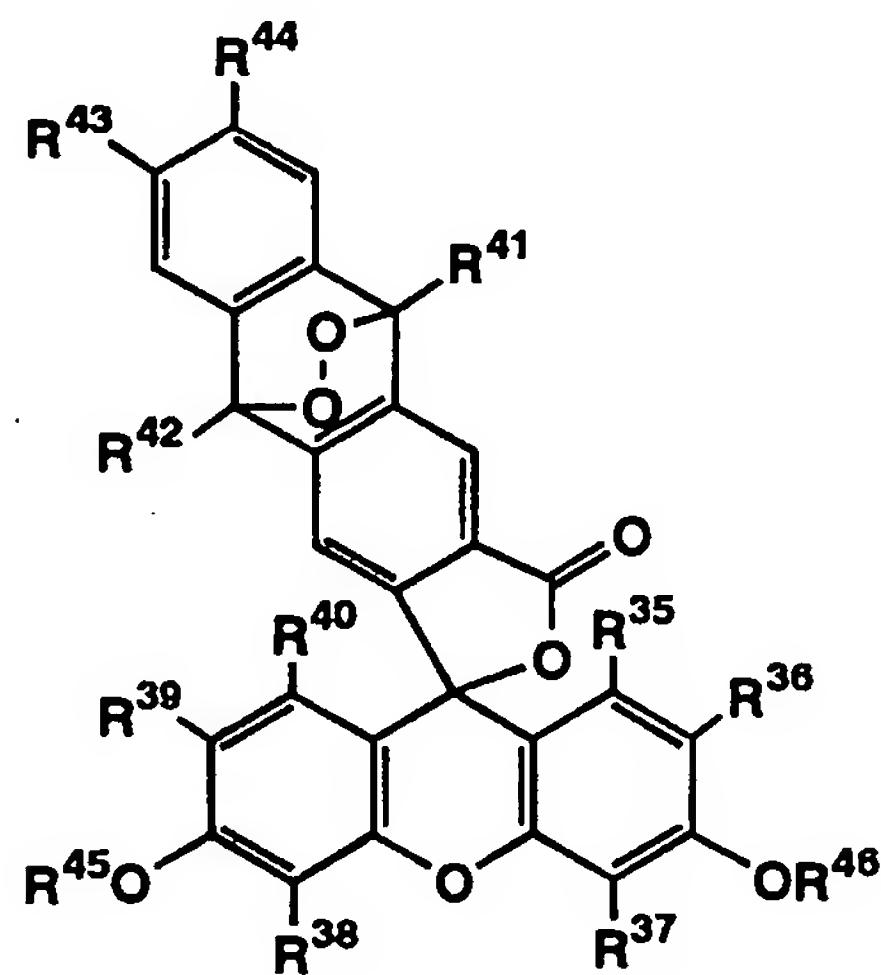
(式中、R¹²、R¹³、R¹⁴、R¹⁵、R¹⁶及びR¹⁷はそれぞれ独立に水素原子、ハロゲン原子、C₁₋₆アルキル基、又はC₁₋₆アルコキシル基を示し、R¹⁸及びR¹⁹はそれぞれ独立にC₁₋₆アルキル基又は置換基を有することもあるアリール基を示し、R²⁰及びR²¹はそれぞれ独立に水素原子、C₁₋₆アルキル基、又はC₁₋₆アルコキシル基を示し、R²²は水素原子又はC₁₋₁₂アルカノイル基を示す)で表される化合物又はその塩も提供される。

さらに別の観点からは、上記式(I)で表される化合物又はその塩を含む一重項酸素測定用試薬；並びに、一重項酸素の測定方法であって、下記の工程：(A)上記式(I)で表される化合物又はその塩と一重項酸素とを反応させる工程、及び(B)上記工程(A)で生成した上記式(II)の化合物又はその塩の蛍光を測定する工程を含む方法が提供される。

また、これらの発明に加えて、下記の式(III)：



(式中、R²³、R²⁴、R²⁵、R²⁶、R²⁷ 及び R²⁸ はそれぞれ独立に水素原子、ハロゲン原子、C₁₋₆ アルキル基、又は C₁₋₆ アルコキシル基を示し、R²⁹ 及び R³⁰ はそれぞれ独立に C₁₋₆ アルキル基又は置換基を有することもあるアリール基を示し、R³¹ 及び R³² はそれぞれ独立に水素原子、C₁₋₆ アルキル基、又は C₁₋₆ アルコキシル基を示し、R³³ 及び R³⁴ はそれぞれ独立に C₁₋₁₂ アルカノイル基を示す) で表される化合物、並びに下記の式 (IV)：



(式中、R³⁵、R³⁶、R³⁷、R³⁸、R³⁹、及び R⁴⁰ はそれぞれ独立に水素原子、ハロゲン原子、C₁₋₆ アルキル基、又は C₁₋₆ アルコキシル基を示し、R⁴¹ 及び R⁴² はそれぞれ独立に C₁₋₆ アルキル基又は置換基を有することもあるアリール基を示し、R⁴³ 及び R⁴⁴

はそれぞれ独立に水素原子、 C_{1-6} アルキル基、又は C_{1-6} アルコキシル基を示し、 R^{45} 及び R^{46} はそれぞれ独立に C_{1-12} アルカノイル基を示す) で表される化合物も提供される。式(III)で表される化合物も一重項酸素測定用試薬として有用である。

図面の簡単な説明

第1図は、式(I)の化合物(化合物13)及び対応する式(II)の化合物の蛍光スペクトルを示す図である。図中、(a)は化合物(13)の蛍光スペクトルを示し、(b)は対応する式(II)の化合物の蛍光スペクトルを示す。

第2図は、化合物(13)の存在下で一重項酸素を発生させ、経時的に蛍光変化を測定した結果を示す図である。図中、(a)は一重項酸素の存在下での結果を示し、(b)は一重項酸素の非存在下(Na_2MoO_4 無添加)での結果を示す。

第3図は、化合物(16)の存在下で一重項酸素を発生させた反応液(反応開始から30分後)を高速液体クロマトグラフィーで分析した結果を示す図である。図中、(a)は一重項酸素の存在下での結果を示し、(b)は一重項酸素の非存在下(H_2O_2 無添加)での結果を示す。また、ピーク1は化合物(16)、ピーク2は対応の式(II)の化合物、及びピーク3は溶媒先端を示す。

第4図は、化合物(13)の存在下で生理的条件下で一重項酸素を発生させ、経時的に蛍光変化を測定した結果を示す図である。図中、(a)は1 mM EP-1存在下での結果を示し；(b)は2.5 mM EP-1存在下での結果を示し；(c)は5 mM EP-1存在下での結果を示す。

発明を実施するための最良の形態

本明細書において用いられる用語の意味は以下のとおりである。アルキル基又はアルコキシル基におけるアルキル部分は、直鎖、分枝鎖、又は環状のいずれでもよい。例えば、 C_{1-6} アルキル基という場合には、炭素数1個から6個の直鎖、分枝鎖、又は環状のアルキル基を意味しており、より具体的には、メチル基、エチル基、n-プロピル基、イソプロピル基、シクロプロピル基、n-ブチル基、sec-

ブチル基、tert-ブチル基、シクロブチル基、n-ベンチル基、n-ヘキシル基、シクロヘキシル基などを用いることができる。アルキル基又はアルコキシル基としては、直鎖又は分枝鎖のものが好ましい。ハロゲン原子としては、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、又はヨウ素原子のいずれでもよい。アルカノイル基は直鎖又は分枝鎖のいずれでもよい。アルカノイル基として、例えば、ホルミル基、アセチル基、プロパノイル基などを用いることができる。

アリール基としては、例えば、環構成原子数が 6 個から 14 個程度の単環性、二環性、又は三環性アリール基を用いることができる。好ましくはフェニル基又はナフチル基、より好ましくはフェニル基を用いることができる。アリール基は環上に 1 個又は 2 個以上の置換基を有していてもよい。2 個以上の置換基を有する場合には、それらは同一でも異なっていてもよい。置換基の種類及び置換位置は特に限定されないが、置換基として C₁₋₆ アルキル基、C₁₋₆ ハロアルキル基、C₁₋₆ アルケニル基、C₁₋₆ アルコキシル基、ハロゲン原子、シアノ基、ニトロ基、置換基を有することもあるアミノ基、カルボキシル基、アルコキシカルボニル基、C₁₋₆ アルカノイル基、C₁₋₆ ハロアルカノイル基、アロイル基、水酸基、アルキレンジオキシ基などを用いることができる。これらのうち、C₁₋₆ アルキル基、C₁₋₆ アルコキシル基、ハロゲン原子などが好ましい。

式(I)において、R¹、R³、R⁴、及び R⁶ が同時に水素原子であることが好ましい。また、R² 及び R⁵ はそれぞれ独立に水素原子又はハロゲン原子であることが好ましく、それらが同時に水素原子であるか、あるいはハロゲン原子であることがより好ましい。R² 及び／又は R⁵ がハロゲン原子である場合には、ハロゲン原子として塩素原子が好ましい。R⁷ 及び R⁸ がそれぞれ独立に置換基を有することもあるフェニル基であることが好ましく、ともにフェニル基であることがさらに好ましく、R¹¹ は水素原子であることが好ましい。

式(II)において、R¹²、R¹⁴、R¹⁵、及び R¹⁷ が同時に水素原子であることが好ましい。また、R¹³ 及び R¹⁶ はそれぞれ独立に水素原子又はハロゲン原子であることが好ましく、それらが同時に水素原子であるか、あるいはハロゲン原子であるこ

とがより好ましい。 R^{13} 及び／又は R^{16} がハロゲン原子である場合には、ハロゲン原子として塩素原子が好ましい。 R^{18} 及び R^{19} がそれぞれ独立に置換基を有することもあるフェニル基であることが好ましく、ともにフェニル基であることがさらに好ましく、 R^{22} は水素原子であることが好ましい。

式(III)において、 R^{23} 、 R^{25} 、 R^{26} 、及び R^{28} が同時に水素原子であることが好ましい。また、 R^{24} 及び R^{27} はそれぞれ独立に水素原子又はハロゲン原子であることが好ましく、それらがともに水素原子であるか、又はともにハロゲン原子であることがより好ましい。 R^{24} 及び／又は R^{27} がハロゲン原子である場合には、ハロゲン原子として塩素原子が好ましい。 R^{29} 及び R^{30} がそれぞれ独立に置換基を有することもあるフェニル基であることが好ましく、ともにフェニル基であることがさらに好ましく、 R^{33} 及び R^{34} がともにアセチル基であることが好ましい。

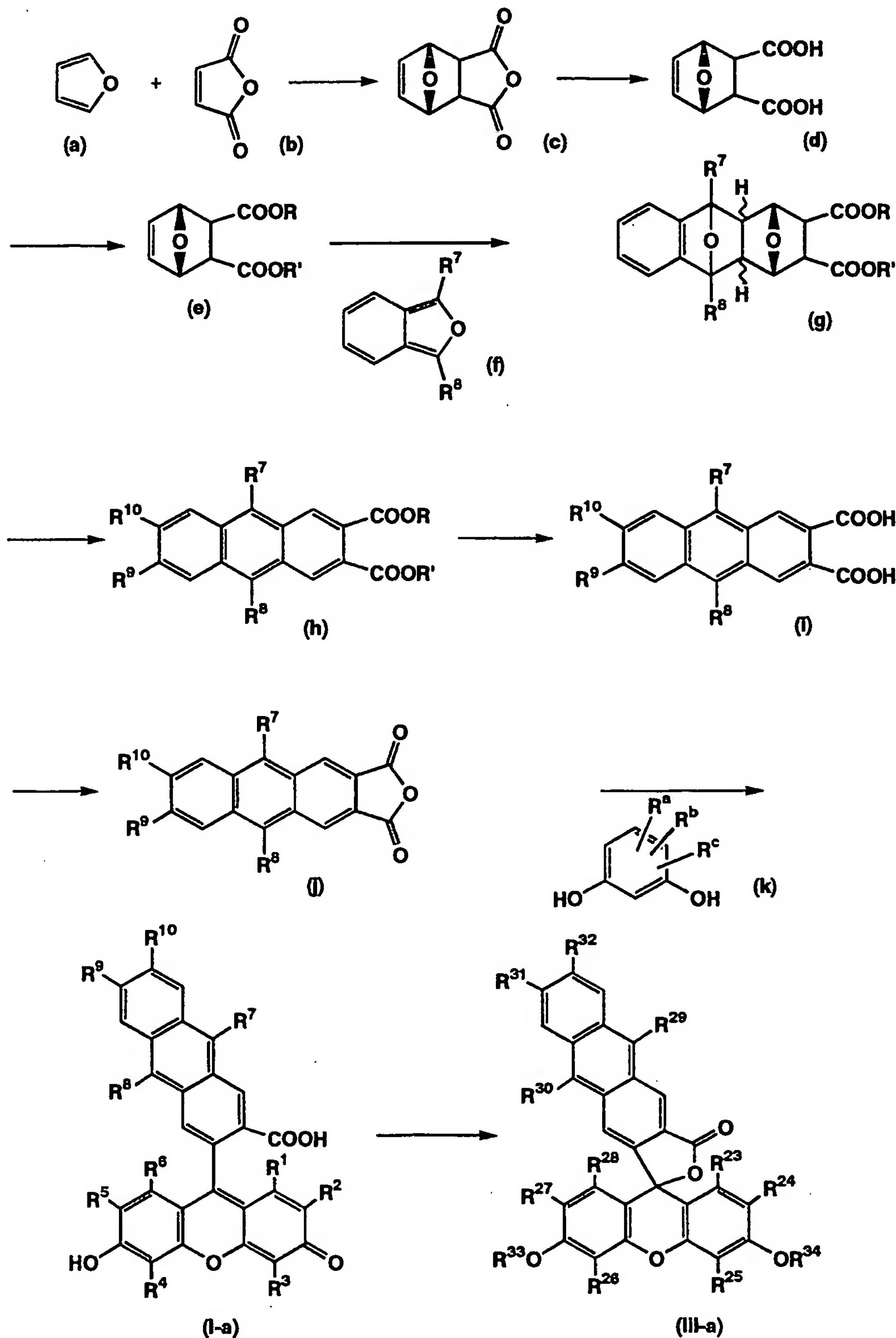
式(IV)において、 R^{35} 、 R^{37} 、 R^{38} 、及び R^{40} が同時に水素原子であることが好ましい。また、 R^{36} 及び R^{39} はそれぞれ独立に水素原子又はハロゲン原子であることが好ましく、それらがともに水素原子であるか、又はともにハロゲン原子であることがより好ましい。 R^{36} 及び／又は R^{39} がハロゲン原子である場合には、ハロゲン原子として塩素原子が好ましい。 R^{41} 及び R^{42} がそれぞれ独立に置換基を有することもあるフェニル基であることが好ましく、ともにフェニル基であることがさらに好ましく、 R^{45} 及び R^{46} がともにアセチル基であることが好ましい。

式(I)及び式(II)の化合物は塩基付加塩として存在することができる。塩基付加塩としては、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩などの金属塩、アンモニウム塩、又はトリエチルアミン塩、ビペリジン塩、モルホリン塩などの有機アミン塩を挙げることができるが、本発明の化合物の塩はこれらに限定されることはない。これらのうち、生理学的に許容される水溶性の塩基付加塩は、本発明の試薬及び測定方法に好適に使用できる。また、遊離形態の式(I)及び式(II)の化合物又はそれらの塩は、水和物又は溶媒和物として存在する場合もあるが、これらの物質はいずれも本発明の範囲に含まれる。溶媒和物を形成する溶媒の種類は特に限定されないが、例えば、エタノール、アセト

ン、イソプロパノールなどの溶媒を例示することができる。

式(I)及び式(II)の化合物は、置換基の種類に応じて1個または2個以上の不斉炭素を有する場合があり、光学異性体又はジアステレオ異性体が存在する場合がある。また、R¹及び／又はR⁶、あるいはR¹²及び／又はR¹⁷の種類によっては、回転障害に基づく光学異性体が存在する場合もある。純粹な形態のこれらの異性体、これらの異性体の任意の混合物、ラセミ体などはいずれも本発明の範囲に含まれる。なお、本発明の式(I)の化合物又は式(II)の化合物は、分子内でラクトン環を形成して、上記の式(III)又は式(IV)の化合物の基本骨格に対応する骨格を有する化合物として存在する場合があり、その他の互変異性体として存在する場合があるが、ラクトン環を形成したこれらの化合物及びその他の異性体も本発明の範囲に包含されることは言うまでもない。また、上記ラクトン形成に基づく光学活性体も本発明の範囲に包含される。

本発明の化合物の製造方法は特に限定されないが、例えば、以下のスキームに示した方法に従って製造することができる。



(スキーム中の記号は上記と同義であり、R 及び R'はそれぞれ独立にカルボキシ

ル基の保護基を示し、R^a、R^b、及びR^cはそれぞれ独立に水素原子、ハロゲン原子、C₁₋₆アルキル基、又はC₁₋₆アルコキシ基を示す)

無水マレイン酸(b)にフラン(a)を反応させることにより得られる化合物(c)に水に加えることにより、化合物(d)を製造することができる。この化合物(d)のカルボキシル基を適宜の保護基で保護した後、化合物(f)と反応させることにより化合物(g)を製造することができる。

化合物(d)のカルボキシル基の保護基としては、他の官能基に関する反応において不活性であり、必要に応じて適宜の手段で脱離させることができるものであれば特に限定されないが、例えば、低級アルキルエステル(メチルエステルなど)を用いることができる。例えば、化合物(d)のメチルエステルを製造する場合には、化合物(d)をアセトンなどの溶媒の存在下、又は無溶媒でヨウ化メチルと反応させればよい。塩基として炭酸炭酸セシウムなどを添加して行うことが好ましい。

Tetrahedron 38, 1425-1430(1982)に記載の方法に従って、化合物(f)と化合物(e)を反応させることにより、化合物(g)を製造し、酸で処理することにより、化合物(h)を製造することができる。反応は、例えばクロロホルムなどの溶媒の存在下で、加温下に行うことができる。化合物(f)は、例えば *Tetrahedron* 38, 1425-1430(1982)などに記載の方法に準じて容易に製造することができる。

化合物(g)から化合物(h)への変換反応は、一般的には塩化メチレンなどの不活性溶媒中で行うことができ、化合物(g)の溶液に濃硫酸などの酸を加えて、激しく攪拌することにより行うことができる。化合物(h)の製造は、上記の方法とは別に、*Tetrahedron* 39, 623-627(1983)又は *Can. J. Chem.*, 53, 256-262(1975)の方法に従っても可能である。

つぎに、得られた化合物(h)からカルボキシル基の保護基を脱離させることにより化合物(i)を製造し、続いて、酸無水物(j)を製造することができる。

カルボキシル基の脱保護は、保護基の種類に応じて適宜の反応を選択することにより行うことができるが、例えば、メチルエステルなどの低級アルキルエステ

ルからエステルを開裂させるには、ジオキサンなどの不活性溶媒の存在下で化合物(h)をメタノール性水酸化カリウムなどのアルカリで処理することにより行うことができる。この反応は、一般的には室温から加温下、好ましくは溶媒の加熱還流下で行うことができる。

化合物(i)の脱水反応は、不活性溶媒の存在下で化合物(i)に脱水剤を加え、一般的には加温下から溶媒の還流温度で行うことができる。脱水剤の種類は特に限定されず、当業者が適宜選択可能であるが、例えば、無水酢酸を溶媒と兼用で用いることができる。

化合物(j)と化合物(k)とを反応させることにより、式(I-a)で表わされる本発明の化合物を製造することができる。反応は、例えば塩化亜鉛、三弗化ホウ素などのルイス酸存在下に溶媒の非存在下で溶融するか、または塩化亜鉛を使用せずに、化合物(i)と化合物(k)とをメタンスルホン酸中で反応させることにより行うことができる。 R^{10} 及び／又は R^{11} が C_{1-6} アルコキシル基の場合には、塩化亜鉛を使用せずに、化合物(i)と化合物(k)とをメタンスルホン酸中で反応させるのが好ましい。レゾルシノール誘導体である化合物(k)は、それ自体公知であり、いずれも容易に製造可能である。さらに、この化合物(I-a)に対して1当量のアシリ化剤を反応させることにより、 R^{11} がアルカノイル基である式(I)の化合物を製造することができ、2当量以上のアシリ化剤を反応させることによって、式(III-a)の化合物を製造することができる。アセチル化を行う場合には、無水酢酸とピリジンなど通常のアセチル化剤を用いることができ、室温から加温下で反応を行うことができる。

式(II)で表わされる化合物は、上記のようにして製造することができる式(I)の化合物に対して、モリブデン酸ナトリウム(Na_2MoO_4)などの塩類を含有する水溶液中で過酸化水素を反応させることにより製造することができる。

本発明の化合物の製造方法を本明細書の実施例にさらに具体的かつ詳細に示した。従って、当業者は、上記のスキームに示した製造方法の説明と実施例の具体的説明を基にして、出発原料及び反応試薬を適宜選択し、必要に応じて反応条件

や工程を適宜変更ないし修飾することにより、本発明の化合物をいずれも製造することが可能である。

なお、上記反応工程において特定の官能基を必要に応じて保護して反応を行うことにより、目的物を効率的に製造することができる場合があるが、保護基については、プロテクティブ・グループス・イン・オーガニック・シンセシス(Protective Groups in Organic Synthesis, T.W.Greene, John Wiley & Sons, Inc., 1981)などに詳しく説明されており、当業者は適宜の保護基を選択することが可能である。

また、上記製造法における生成物の単離、精製は通常の有機合成で用いられる方法、例えば濾過、抽出、洗浄、乾燥、濃縮、結晶化、各種クロマトグラフィー等を適宜組み合わせ行うことができる。また、上記工程における製造中間体は、特に精製することなく次の反応に供することも可能である。本発明の化合物の塩を製造する場合には、上記製造法においてそれぞれの化合物の塩が得られる場合はそのまま精製すればよればよく、遊離形態の化合物が得られる場合には、遊離形態の化合物を適当な溶媒に溶解又は懸濁した後、塩基を加えて塩を形成させ、必要に応じて精製を行えばよい。

上記式(I)で表される化合物又はその塩は、緩和な条件下、例えば生理的条件下で一重項酸素と反応して、対応の上記式(II)の化合物又はその塩を与える性質を有している。式(I)の化合物又はその塩は実質的に非蛍光性であり、一方、式(II)の化合物又はその塩は高強度の蛍光を発する性質を有している。従って、上記式(I)で表される化合物又はその塩を一重項酸素と反応させた後、生成した上記式(II)の化合物又はその塩の蛍光を測定することによって、一重項酸素を測定することが可能である。式(I)の化合物又はその塩は酸素ラジカル等とは実質的に反応せず、一重項酸素と特異的に反応する性質を有している。また、式(II)の化合物又はその塩は極めて蛍光強度に優れているため、式(I)の化合物又はその塩を一重項酸素測定用試薬として用いると、個々の細胞や特定の組織中に局在する一重項酸素を正確に測定できる。

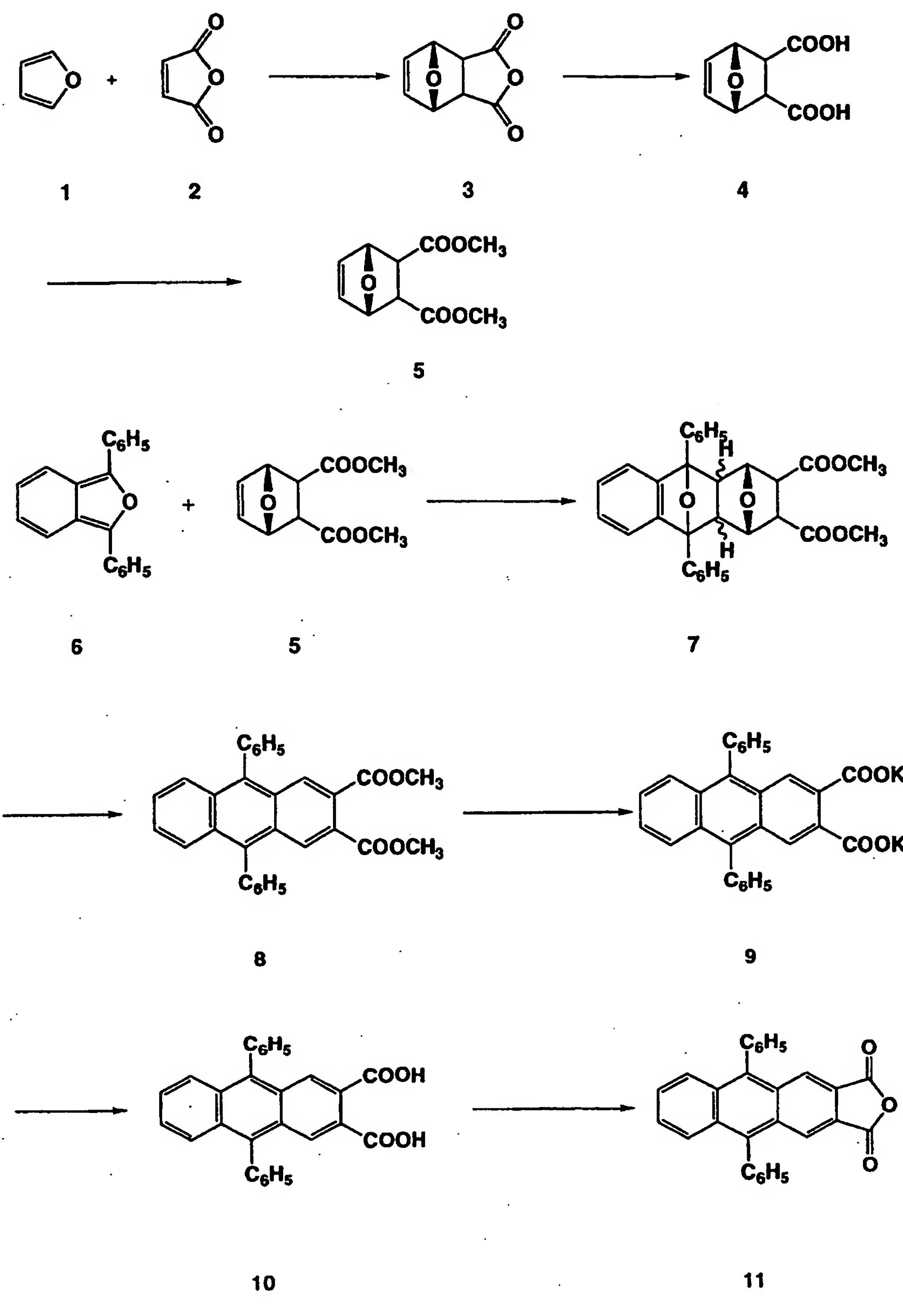
本明細書において用いられる「測定」という用語は、定量、定性、又は診断などの目的で行われる測定、検査、検出などを含めて、最も広義に解釈しなければならない。本発明の一重項酸素の測定方法は、一般的には、(A)上記式(I)で表される化合物又はその塩と一重項酸素とを反応させる工程、及び(B) 上記工程(a)で生成した上記式(II)の化合物又はその塩の蛍光を測定する工程を含んでいる。式(II)の化合物又はその塩の蛍光の測定は通常の方法で行うことができ、インピトロで蛍光スペクトルを測定する方法や、バイオイメージングの手法を用いてインピボで蛍光スペクトルを測定する方法などを採用することができる。例えば、定量を行う場合には、常法に従って予め検量線を作成しておくことが望ましいが、定量的な一重項酸素の発生系として、例えば、ナフタレンエンドパーオキシド系(Saito, I., et al., J. Am. Chem. Soc., 107, pp.6329-6334, 1985)などを利用することができる。

なお、式(I)において R^{11} が C_{1-12} アルカノイル基の化合物若しくはその塩、又は式(III)の化合物は、細胞膜を通過して細胞内部に取り込まれた後、細胞内のエステラーゼなどの酵素によりアルカノイル基が加水分解された産物〔式(I)において R^{11} が水素原子の化合物又はその塩〕を与えるが、この加水分解物は容易に細胞外に排出されずに細胞内の一重項酸素と反応し、式(II)において R^{22} が水素原子の化合物を与える。従って、これらの化合物を測定試薬として用いると、個々の細胞内に局在する一重項酸素をバイオイメージング手法により高感度に測定できる。

本発明の一重項測定用試薬としては、上記式(I)の化合物若しくはその塩、又は式(III)の化合物をそのまま用いてもよいが、必要に応じて、試薬の調製に通常用いられる添加剤を配合して組成物として用いてもよい。例えば、生理的環境で試薬を用いるための添加剤として、溶解補助剤、pH 調節剤、緩衝剤、等張化剤などの添加剤を用いることができ、これらの配合量は当業者に適宜選択可能である。これらの組成物は、粉末形態の混合物、凍結乾燥物、顆粒剤、錠剤、液剤など適宜の形態の組成物として提供される。

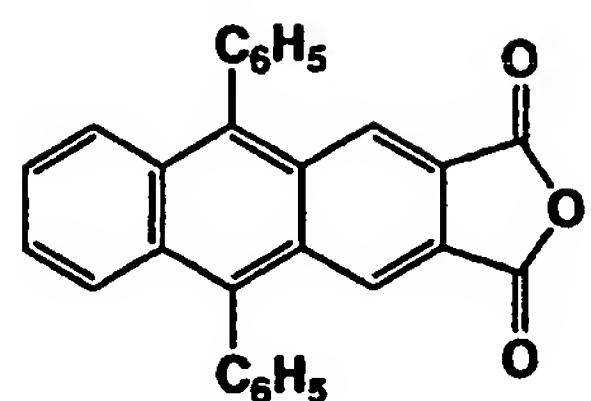
実施例

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は下記の実施例に限定されることはない。以下のスキーム中、化合物番号は実施例中の化合物番号と対応させてある。

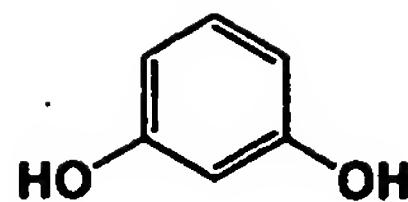


WO 99/51586

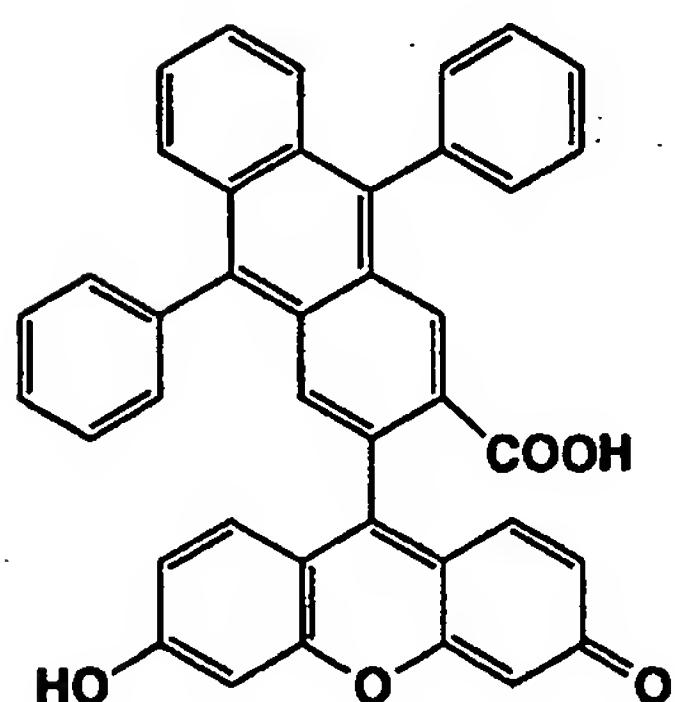
PCT/JP99/01658



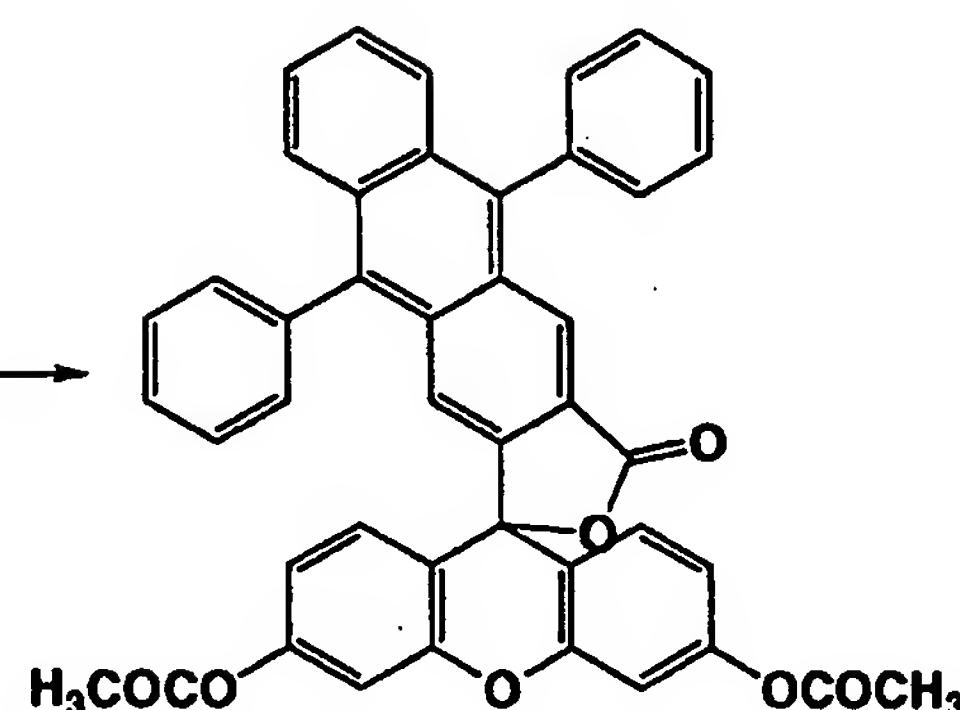
11



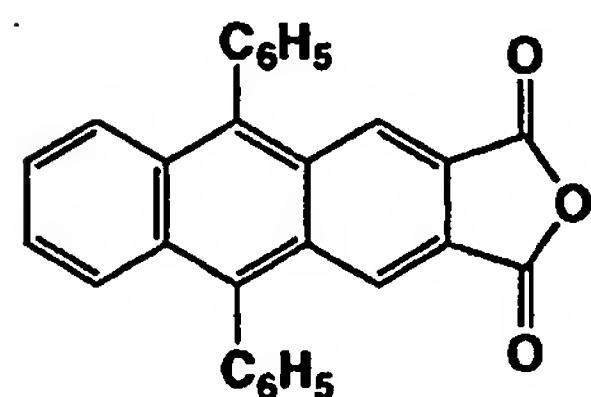
12



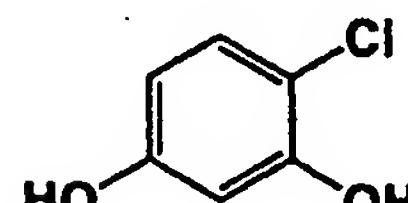
13



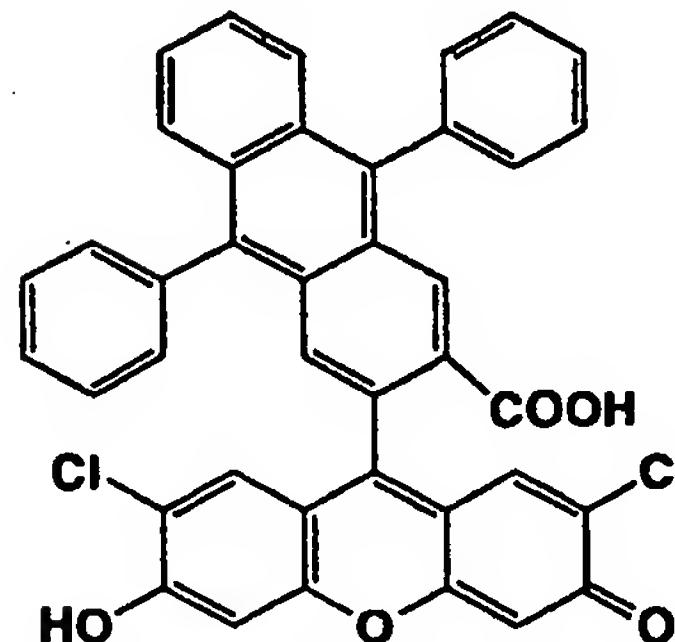
14



11

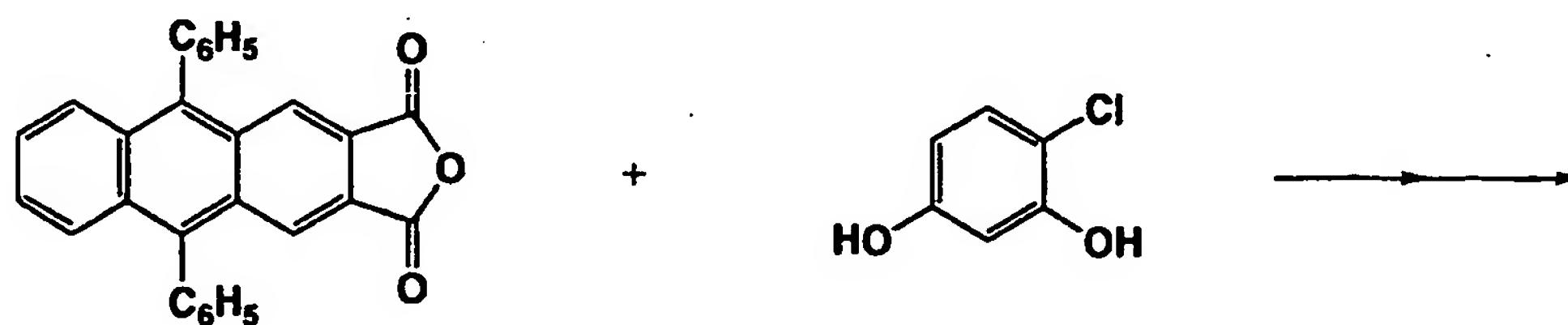


15



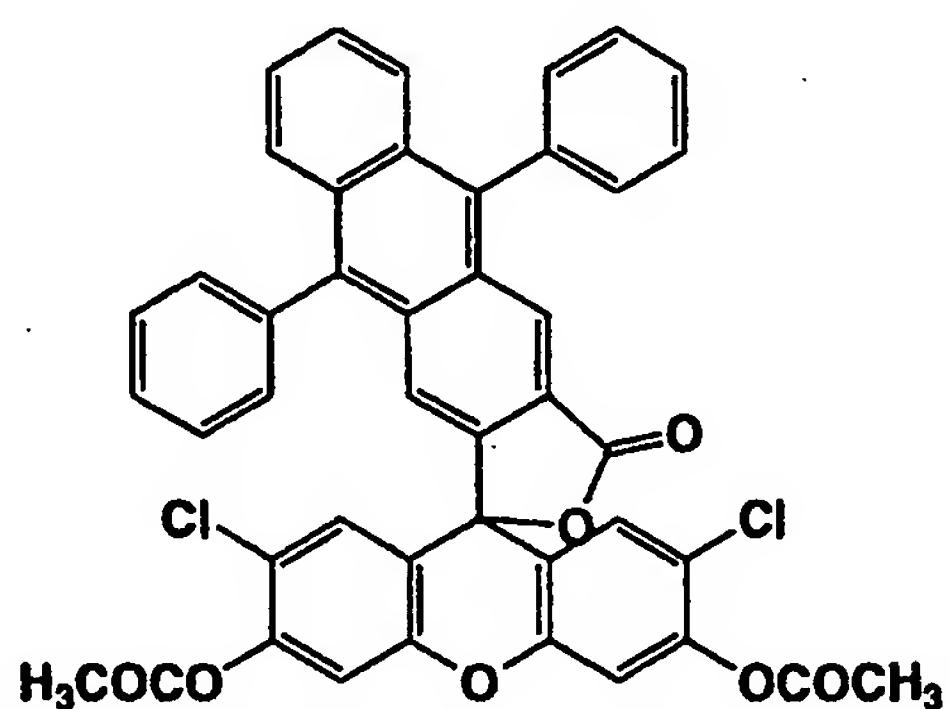
16

16

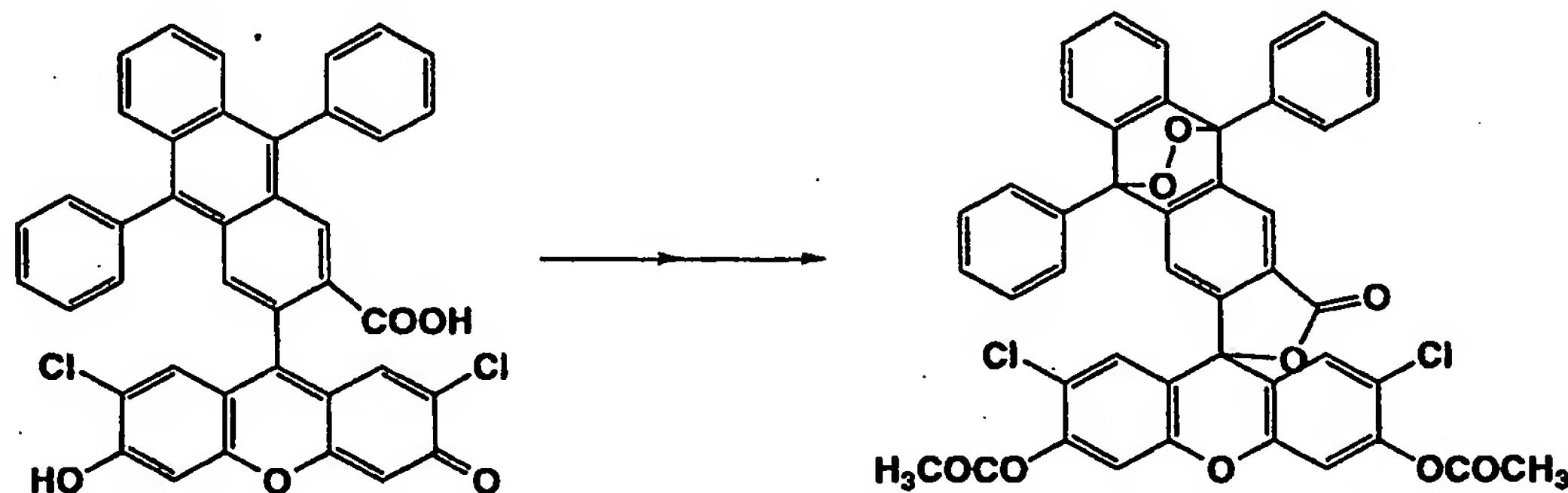


11

15



17



16

18

例 1：化合物の製造

粉末状に碎いた無水マレイン酸(2)をテトラヒドロフラン(THF)に溶解し蒸留した新鮮なフラン(1) 1.05 当量を加え、室温下 10 日間攪拌した。析出した結晶を濾取して、化合物(3)を得た。無色結晶。収率 46%。

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 3.18 (s, 2H), 5.46 (m, 2H), 6.58(m, 2H)

MS (EI⁺): 121 (M⁺-COOH)

m.p.: 120-122 °C

化合物(3)を水に懸濁し、室温下2時間攪拌した。懸濁液は徐々に透明な溶液となつた。水を凍結乾燥により除去し、化合物(4)を得た。無色粉末。収率 100%。

¹H NMR (300 MHz, DMSO): δ 2.61 (s, 2H), 5.03 (m, 2H), 6.43 (m, 2H)

m.p.: 134°C

化合物(4)のアセトン溶液に6当量のヨウ化メチル、1.1 当量の炭酸セシウムを加え、室温下に7日間攪拌した。反応液を減圧下に濾過し、不溶物を塩化メチレンでよく洗い、得られた有機層を減圧下濃縮した後、飽和食塩水で洗浄した。硫酸ナトリウムで乾燥した後、減圧下溶媒を留去して粗生成物を得、メタノールより再結晶して化合物(5)を得た。無色板状晶。収率 56%。

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 2.83 (s, 2H), 3.71 (s, 6H), 5.27 (m, 2H), 6.46 (m, 2H)

MS (FAB⁺): 213 (M⁺+1)

m.p.: 121°C

Anal. Calcd for C₁₀H₁₂O₅: C, 56.60%; H, 5.70%. Found: C, 56.32%; H, 5.66%.

1当量の化合物(6)と1.05当量の化合物(5)のクロロホルム溶液をアルゴン下に2日間加熱還流した。クロロホルムを減圧下留去した後、残渣にイソプロピルエーテルを加えて、沈殿物を濾取した。沈殿物をペンタンで洗浄し、化合物(7)を得た。無色粉末。収率 100%。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) を測定したところ、2種類の異性体の混合物であることが確認された（異性体混合比：75/25）

1st isomer:

δ 2.59 (s, 2H), 2.90 (s, 2H), 3.55 (s, 6H), 4.60 (s, 2H), 7.14 (s, 4H), 7.4-7.7 (m, 10H)

2nd isomer:

δ 3.01 and 3.04 (2s, 2H), 3.64 (s, 6H), 4.65 (s, 2H), 7.14 (s, 4H), 7.4-7.7 (m, 10H)

MS (EI⁺): 482 (M⁺ weak), 451 (M⁺-CH₃O)

m.p.: 237°C (decomp.)

化合物(7)の塩化メチレン溶液に濃硫酸を加え、激しく攪拌しながら 30 分加熱還流した。メタノールで処理した後、飽和炭酸水素ナトリウム溶液で有機層を洗浄した。硫酸マグネシウムで乾燥した後、溶媒を減圧留去して粗生成物を得た。シリカゲルクロマトグラフィーにより精製した後、メタノールより再結晶して、化合物(8)を得た。黄色針状晶。収率 43%。

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 3.85 (s, 6H), 7.40-7.74 (m, 14H), 8.13 (s, 2H)

MS (EI⁺): 446 (M⁺), 415 (M⁺-CH₃O)

m.p.: 200-201 °C

Anal. Calcd for C₃₀H₂₂O₄: C, 80.70%; H, 4.97%. Found: C, 80.44%; H, 4.74%.

化合物(8)のジオキサン溶液に 1M のメタノール性水酸化カリウムを加え、30 分加熱還流した。反応液を冷却して析出物を濾取し、無水メタノールで洗浄して化合物(9)を得た。淡黄色粉末。収率 91%。

¹H NMR (300 MHz, D₂O): δ 7.29-7.63 (m, 14H), 7.69 (s, 2H)

MS (FAB⁺): 495 (M⁺+1)

m.p.: 300°C以上

化合物(9)を水に懸濁させた溶液に 2N 塩酸を添加して酸性とし、生成物をエーテル抽出した後、エーテル層を飽和食塩水で洗浄して硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を減圧留去して化合物(10)を得た。黄色粉末。収率 100%。

¹H NMR (300 MHz, DMSO): δ 7.49-7.72 (m, 14H), 7.95 (s, 2H)

MS (EI⁺): 418 (M⁺; weak), 400 (M⁺-H₂O)

化合物(10)に大過剰の無水酢酸を加え、10 分加熱還流した。反応液を冷却して析出した結晶を濾取して化合物(11)を得た。黄色結晶。収率 96%。

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.45-7.80 (m, 14H), 8.46 (s, 2H)

MS (EI⁺): 400 (M⁺)

m.p.: 300 °C以上

Anal. Calcd for $C_{28}H_{16}O_3$: C, 83.99%; H, 4.02%. Found: C, 84.27%; H, 3.99%.

1当量の化合物(11)と2当量のレゾルシノール(12)、1当量の塩化亜鉛をよく混和した。この混合物を固体のままアルゴン下に180°Cで1時間加熱した。冷却後生成物を碎き、2N 塩酸を加えて10分間加熱還流した。析出物を濾取して粗生成物を得た。シリカゲルクロマトグラフィーにより精製し、化合物(13)を得た。橙色粉末。収率48%。

1H NMR (300 MHz, DMSO): δ 6.46 (dd, 2H, Ja=8.8, Jb=2.1), 6.57 (m, 2H), 6.66 (d, 2H, J=8.8), 7.28 (s, 1H), 7.34-7.77 (m, 14H), 8.24 (s, 1H)
MS (EI $^+$): 584 (M $^+$), 540 (M $^+$ -CO₂)

m.p.: 270 °C

化合物(13)に無水酢酸及びピリジンを添加し、室温下に5分間攪拌した。反応液を0°Cの2% 塩酸にあけ、塩化メチレンで抽出した。有機層を2% 水酸化ナトリウム、飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥した。塩化メチレンを減圧留去して粗生成物を得、ベンゼンより再結晶して化合物(14)を得た。黄色結晶。収率67%。

1H NMR (300 MHz, DMSO): δ 2.26 (s, 6H), 6.91 (dd, 2H, Ja=8.7, Jb=2.2), 6.98 (d, 2H, J=8.7), 7.24 (d, 2H, J=2.2), 7.30-7.80 (m, 15H), 8.30 (d, 1H, J=0.72)
MS (EI $^+$): 668 (M $^+$), 624 (M $^+$ -CO₂)

Anal. Calcd for $C_{44}H_{28}O_7$: C, 79.03%; H, 4.22%. Found: C, 79.27%; H, 4.19%.

m.p.: 235°C

1当量の化合物(11)のメタンスルホン酸溶液に、2当量のクロロレゾルシノール(15)を加え、アルゴン下に80°Cで2日間加熱した。冷却した反応液を氷水にあけ、析出物を濾取した。乾燥後、シリカゲルクロマトグラフィーにより精製して、化合物(16)を得た。橙色粉末。収率59%。

1H NMR (300 MHz, DMSO): δ 6.80 (s, 2H), 6.84 (s, 2H), 7.31-7.78 (m, 15H), 8.28 (s, 1H), 11.14 (s, 2H)
MS(FAB $^+$): 653:655:657=9:6:1 (M $^+$ +1)

m.p.: 243°C(decomp.)

1当量の化合物(11)のメタンスルホン酸溶液に、2当量のクロロレゾルシノール(15)を加え、アルゴン下に80°Cで2日間加熱した。冷却した反応液を氷水にあけ、析出物を濾取して乾燥した。この析出物に無水酢酸とビリジンを添加して80°Cで5分加熱し、反応液を0°Cの2%塩酸にあけ、塩化メチレンで抽出した。有機層を2%水酸化ナトリウム、飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥し、塩化メチレンを減圧留去して粗生成物を得た。シリカゲルクロマトグラフィーにより精製した後、ベンゼンより再結晶して化合物(17)を得た。黄色結晶。収率16%。

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 2.36 (s, 6H), 6.88 (s, 2H), 7.12 (s, 2H), 7.35-7.79 (m, 15H), 8.61 (s, 1H)

MS(FAB⁺): 737:739:741=9:6:1 (M⁺+1)

m.p.: 246°C (decomp.)

Anal. Calcd for C₄₄H₂₆Cl₂O₇: C, 71.65%; H, 3.55%. Found: C, 71.69%; H, 3.48%.

化合物(16)のジメチルスルホキシド(DMSO)溶液を水酸化ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、炭酸ナトリウム、モリブデン酸ナトリウム(Na₂MoO₄)を含有する水溶液と混和した。この混合物に30%過酸化水素水を5回に分けて添加し、この間、反応温度が上がりすぎないように適宜冷却した。リン酸で反応液を酸性にした後、エーテルで抽出した。飽和食塩水で洗浄した有機層を硫酸マグネシウムで乾燥した後、エーテルを減圧留去した。得られた固体に無水酢酸、ビリジンを添加し、室温下に5分間攪拌した後、反応液を0°Cの2%塩酸にあけて塩化メチレンで抽出した。有機層を2%水酸化ナトリウム、飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧留去して粗生成物を得た。シリカゲルクロマトグラフィーにより精製して化合物(18)を得た。淡黄色粉末。収率36%。

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 2.34 (s, 3H), 2.38 (s, 3H), 6.74, 6.80, 7.08, 7.13 (4s, 4H), 7.04-7.78 (m, 15H), 7.84 (s, 1H)

MS(FAB⁺): 769:771:773=9:6:1 (M⁺+1); 737:739:741=9:6:1 (M⁺+1-O₂)

m.p.: 189°C (decomp.)

例2：一重項酸素の測定

例1で得た化合物(13)を 0.1 mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) を含む 100 mM リン酸緩衝液 (pH10.5) に溶解し、Na₂MoO₄ (1 mM) 及び DMSO (0.1%) を加えて 25°C で蛍光スペクトルを測定した (図 1(a))。この混合物に過酸化水素水 (20 mM) を 1 時間おきに 5 回に分けて加えた後 (反応開始より 6 時間後) に蛍光を測定した (図 1(b))。蛍光の測定条件は以下のとおりである。励起波長: 495.0 nm; 蛍光波長: 515.0 nm; スリット(Ex/E_m): 2.5 nm/2.5 nm.

例3：一重項酸素の測定

一重項酸素の発生系 [0.1 mM EDTA; 100 mM リン酸緩衝液 (pH10.5); Na₂MoO₄ (1 mM); DMSO (0.1%); 過酸化水素水 (20 mM × 1); 25 °C] を用い、化合物(13)の存在下で経時的に蛍光変化を測定した (図 2(a))。対照として、Na₂MoO₄ を添加せずに (一重項酸素の非存在下) で測定を行った (図 2(b))。この結果、一重項酸素の発生量に応じた蛍光の増加が認められた。

上記とほぼ同じ系 (31 mM NaOH; 16 mM NaHCO₃; 1 mM Na₂CO₃; 138 mM Na₂MoO₄)において化合物(16)を用い、反応開始前と 15 分おきに過酸化水素を 2 回添加した後 (反応開始から 30 分後) のそれぞれの反応液を高速液体クロマトグラフィーで分析した結果を図 3 に示す。高速液体クロマトグラフィーの測定条件は以下のとおりである。

カラム: Inertsil ODS

溶出液: 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4)/アセトニトリル=6/4

カラム温度: 室温

検出: 505 nm

例4：一重項酸素の測定

一重項酸素の発生系としてナフタレンエンドバーオキシド系化合物 EP-1

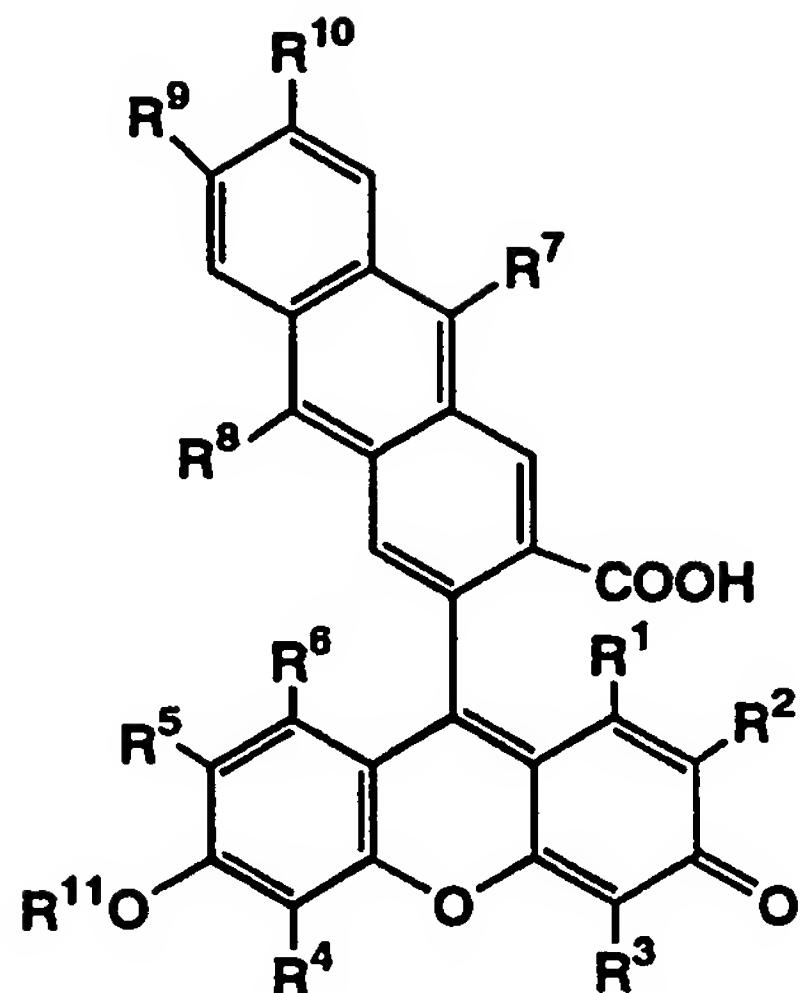
(Saito, I., et al., J. Am. Chem. Soc., 107, pp.6329-6334, 1985) を用い、37°Cの中性条件下で所定量の一重項酸素を経時的に発生させ、化合物(13)の存在下で蛍光を測定した〔反応液：0.1 mM EDTA; 100 mM リン酸緩衝液 (pH7.4); DMSO (0.1%)〕。この結果、EP-1 の濃度を 1 mM から 2.5 mM 及び 5 mM に増加させるについて、一重項酸素の発生量に応じた蛍光の増加が認められた（図4）。

産業上の利用可能性

本発明の一般式(I) または一般式(III)で表される実質的に非蛍光性の化合物又はその塩は一重項酸素と効率的に反応して、一般式(II)で表される蛍光性の化合物又はその塩を与える。従って、一般式(I) または一般式(III)で表される化合物又はその塩を一重項測定用試薬として用い、生細胞や生組織中に局在する一重項酸素と反応して生成する一般式(II) または一般式(IV)で表される化合物の蛍光を測定すると、例えばバイオイメージングの手法により極めて特異的かつ高感度に一重項酸素を測定できる。

請求の範囲

1. 下記の一般式(I)：

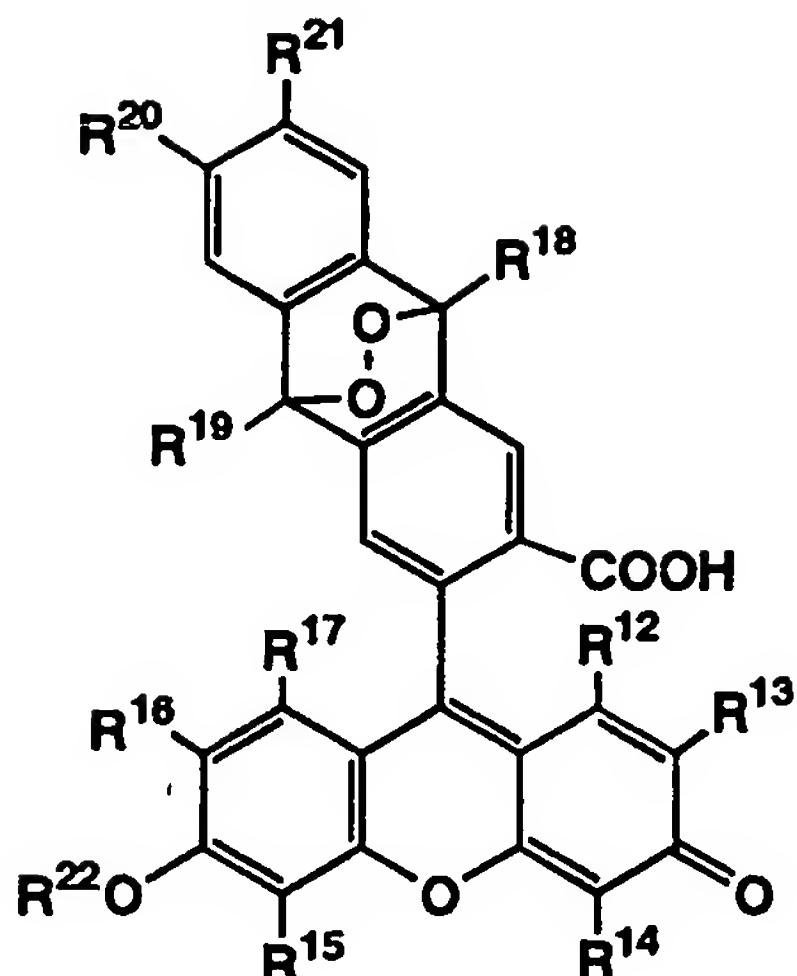


(式中、R¹、R²、R³、R⁴、R⁵、及びR⁶はそれぞれ独立に水素原子、ハロゲン原子、C₁₋₆アルキル基、又はC₁₋₆アルコキシル基を示し、R⁷及びR⁸はそれぞれ独立にC₁₋₆アルキル基又は置換基を有することもあるアリール基を示し、R⁹及びR¹⁰はそれぞれ独立に水素原子、C₁₋₆アルキル基、又はC₁₋₆アルコキシル基を示し、R¹¹は水素原子又はC₁₋₁₂アルカノイル基を示す)で表される化合物又はその塩。

2. R¹、R³、R⁴、及びR⁶が水素原子であり、R²及びR⁵がそれぞれ独立にハロゲン原子であり、R⁷及びR⁸がそれぞれ独立に置換基を有することもあるフェニル基であり、R¹¹が水素原子である請求の範囲第1項に記載の化合物又はその塩。

3. R¹、R³、R⁴、及びR⁶が水素原子であり、R²及びR⁵が塩素原子であり、R⁷及びR⁸がフェニル基であり、R¹¹が水素原子である請求の範囲第1項に記載の化合物又はその塩。

4. 下記の一般式(II)：



(式中、R¹²、R¹³、R¹⁴、R¹⁵、R¹⁶ 及び R¹⁷ はそれぞれ独立に水素原子、ハロゲン原子、C₁₋₆ アルキル基、又は C₁₋₆ アルコキシル基を示し、R¹⁸ 及び R¹⁹ はそれぞれ独立に C₁₋₆ アルキル基又は置換基を有することもあるアリール基を示し、R²⁰ 及び R²¹ はそれぞれ独立に水素原子、C₁₋₆ アルキル基、又は C₁₋₆ アルコキシル基を示し、R²² は水素原子又は C₁₋₁₂ アルカノイル基を示す) で表される化合物又はその塩。

5. R¹²、R¹⁴、R¹⁵、及び R¹⁷ が水素原子であり、R¹³ 及び R¹⁶ がそれぞれ独立にハロゲン原子であり、R¹⁸ 及び R¹⁹ はそれぞれ独立に置換基を有することもあるフェニル基であり、R²² が水素原子である請求の範囲第 4 項に記載の化合物又はその塩。

6. R¹²、R¹⁴、R¹⁵、及び R¹⁷ が水素原子であり、R¹³ 及び R¹⁶ が塩素原子であり、R¹⁸ 及び R¹⁹ がフェニル基であり、R²² が水素原子である請求の範囲第 4 項に記載の化合物又はその塩。

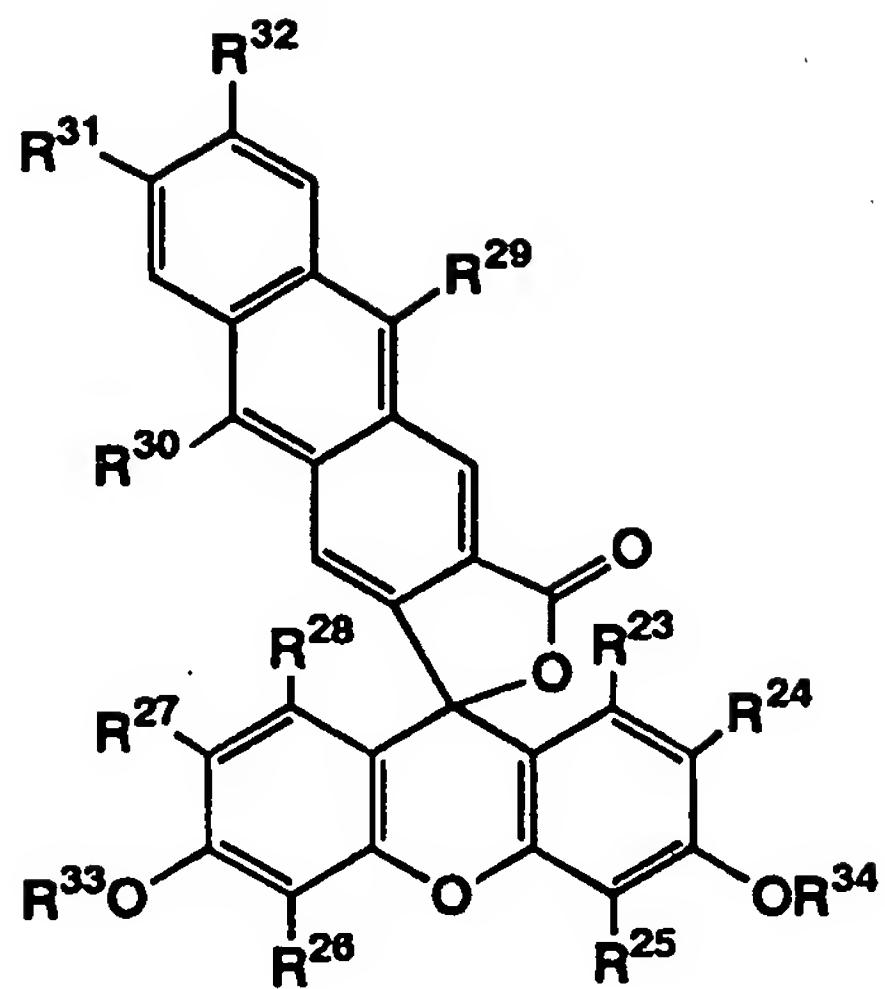
7. 請求の範囲第 1 項から第 3 項のいずれか 1 項に記載の化合物又はその塩を含む一重項酸素測定用試薬。

8. 一重項酸素の測定方法であって、下記の工程：

(A) 請求の範囲第 1 項から第 3 項のいずれか 1 項に記載の化合物又はその塩と一重項酸素とを反応させる工程、及び

(B) 上記工程(A)で生成した請求の範囲第 4 項から第 6 項のいずれか 1 項に記載の化合物又はその塩の蛍光を測定する工程
を含む方法。

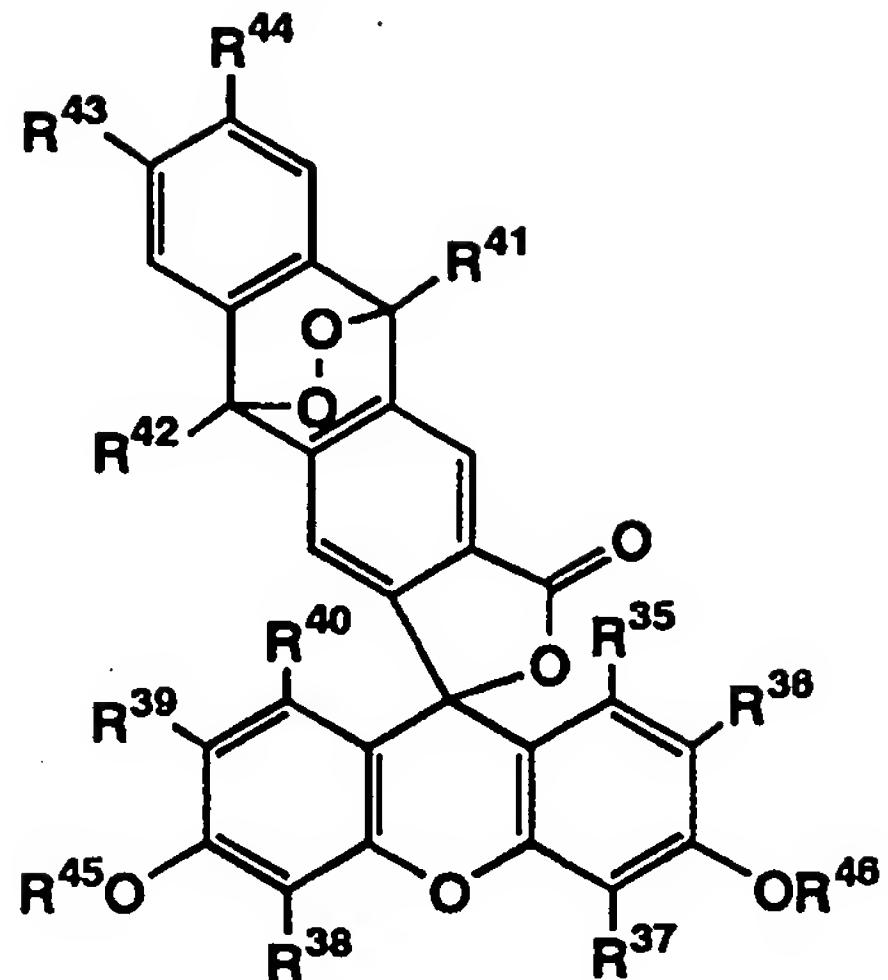
9. 下記の式(III) :



(式中、R²³、R²⁴、R²⁵、R²⁶、R²⁷ 及び R²⁸ はそれぞれ独立に水素原子、ハロゲン原子、C₁₋₆ アルキル基、又は C₁₋₆ アルコキシル基を示し、R²⁹ 及び R³⁰ はそれぞれ独立に C₁₋₆ アルキル基又は置換基を有することもあるアリール基を示し、R³¹ 及び R³² はそれぞれ独立に水素原子、C₁₋₆ アルキル基、又は C₁₋₆ アルコキシル基を示し、R³³ 及び R³⁴ はそれぞれ独立に C₁₋₁₂ アルカノイル基を示す) で表される化合物又はその塩。

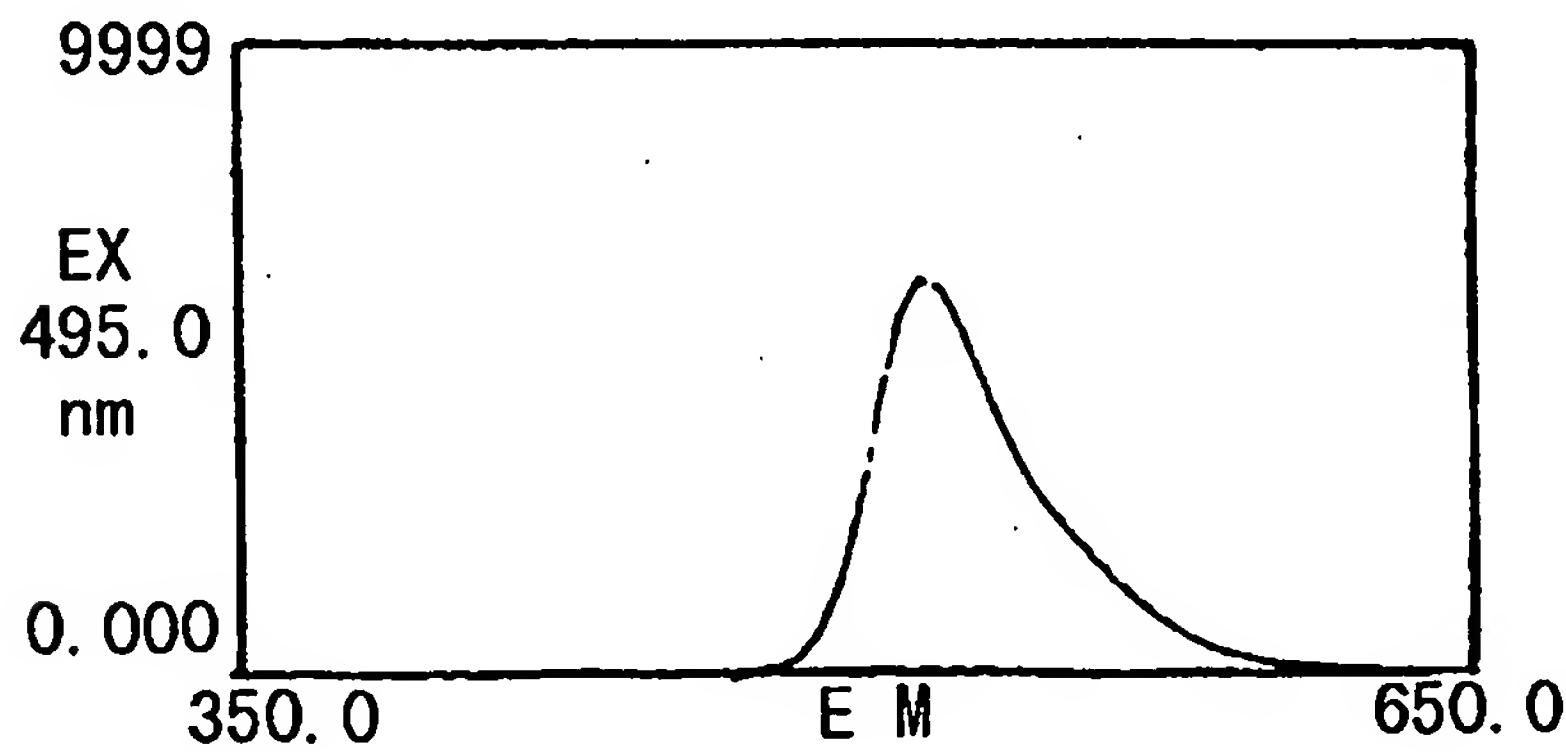
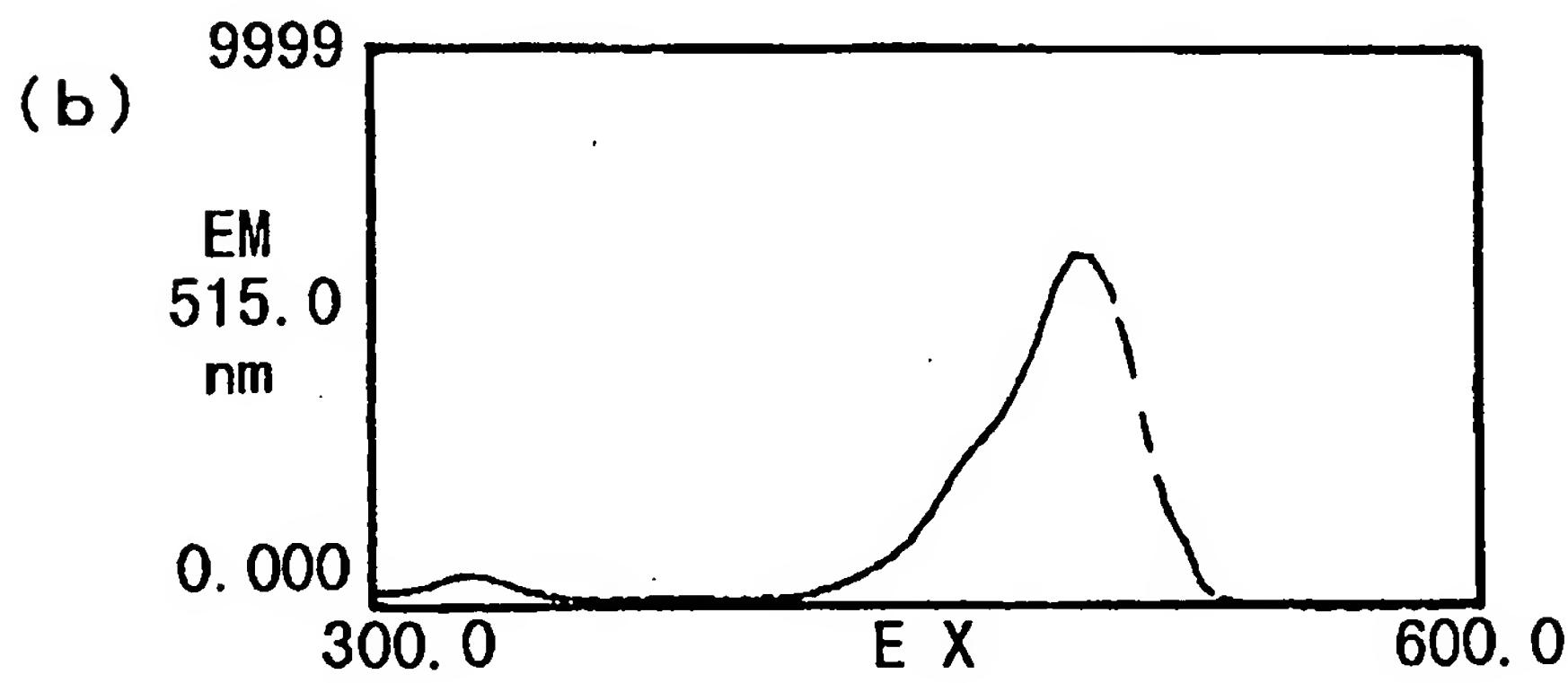
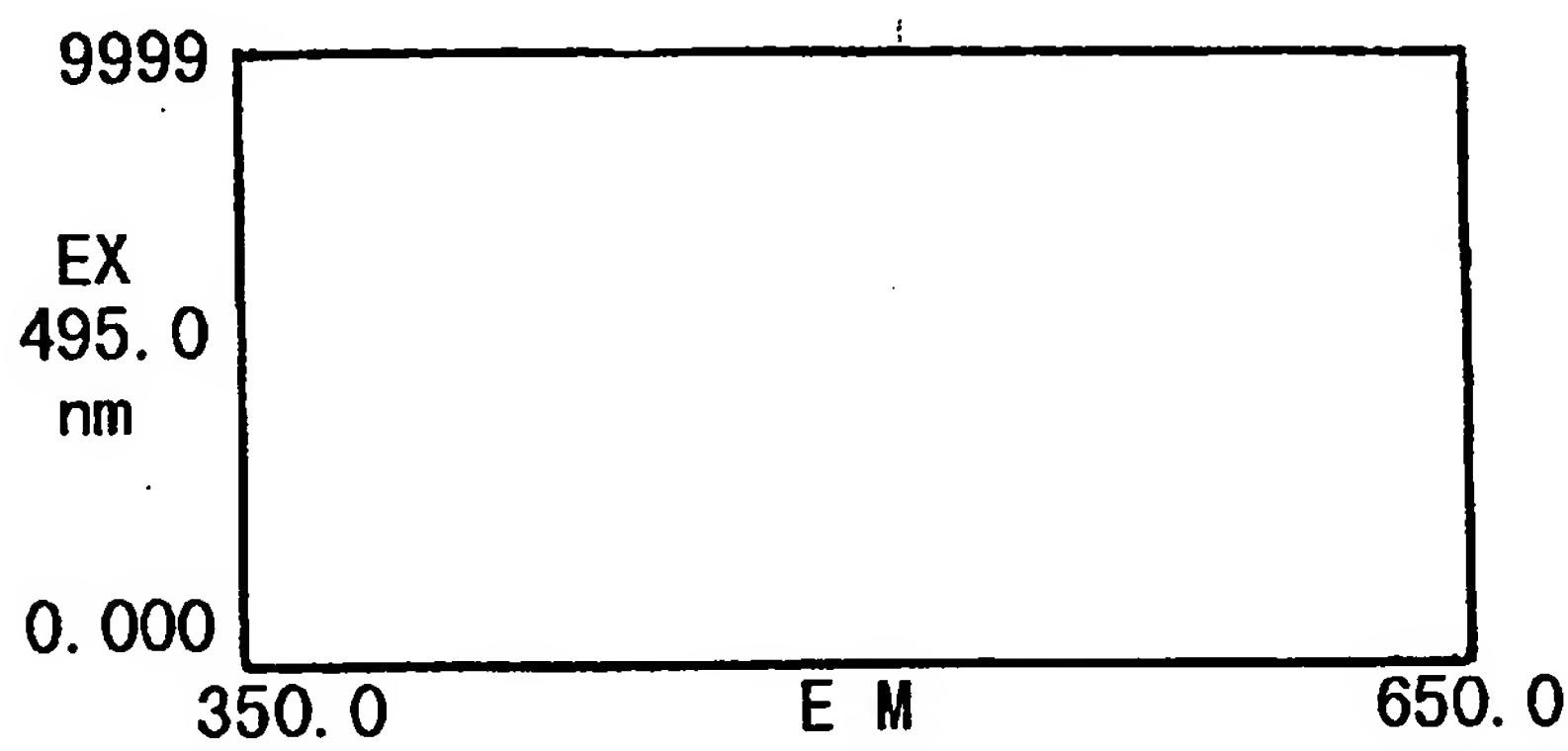
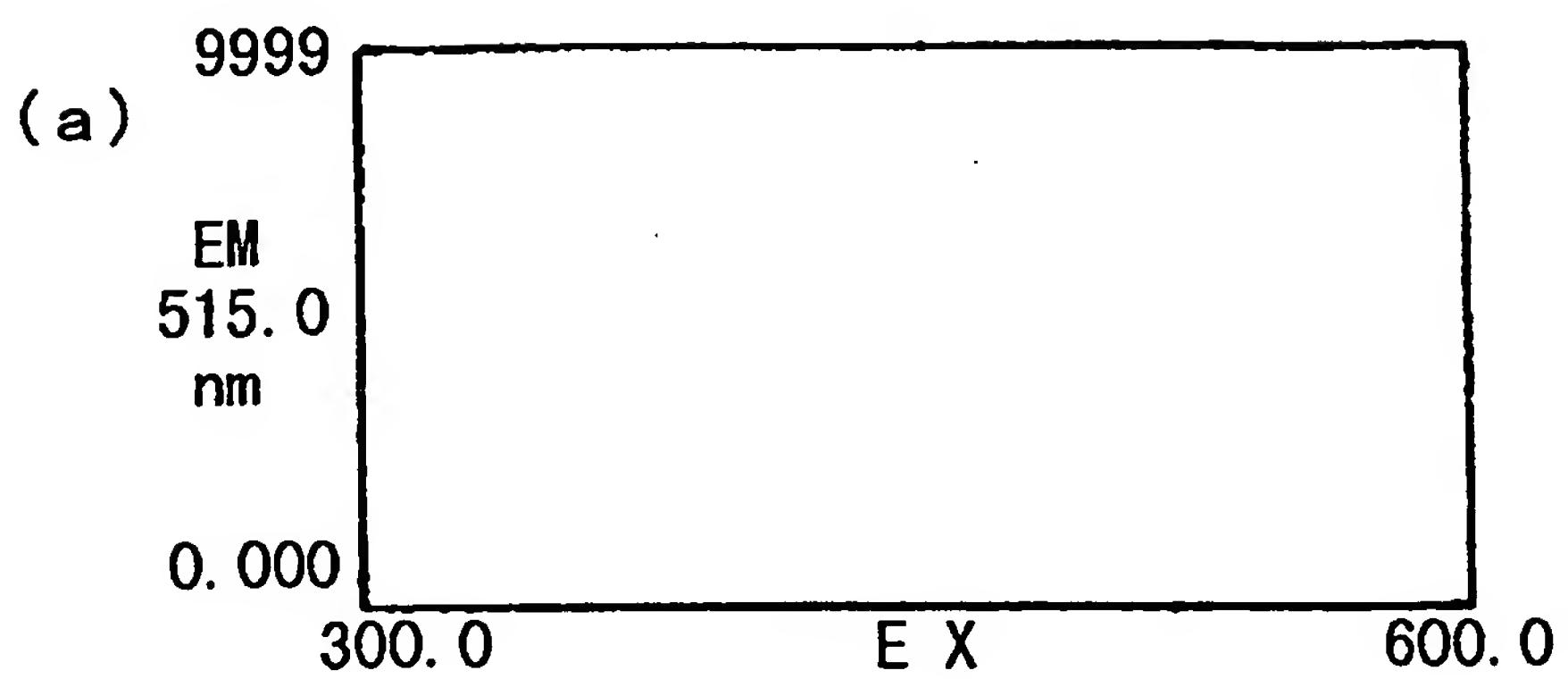
10. 請求の範囲第 9 項に記載の化合物又はその塩を含む一重項酸素測定用試薬。

11. 下記の式 (IV) :

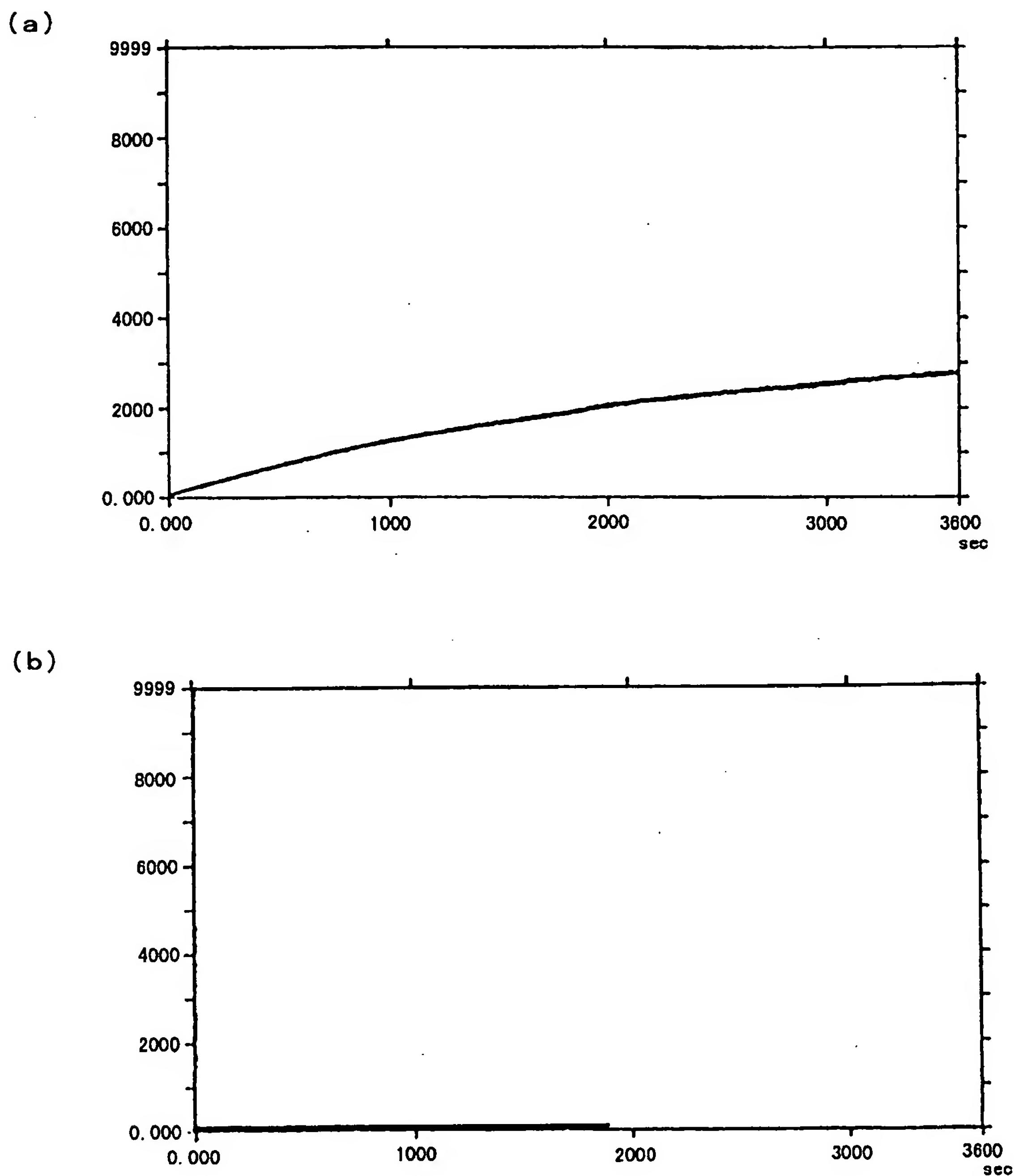


(式中、 R^{35} 、 R^{36} 、 R^{37} 、 R^{38} 、 R^{39} 、及び R^{40} はそれぞれ独立に水素原子、ハロゲン原子、 C_{1-6} アルキル基、又は C_{1-6} アルコキシル基を示し、 R^{41} 及び R^{42} はそれぞれ独立に C_{1-6} アルキル基又は置換基を有することもあるアリール基を示し、 R^{43} 及び R^{44} はそれぞれ独立に水素原子、 C_{1-6} アルキル基、又は C_{1-6} アルコキシル基を示し、 R^{45} 及び R^{46} はそれぞれ独立に C_{1-12} アルカノイル基を示す)で表される化合物又はその塩。

第1図

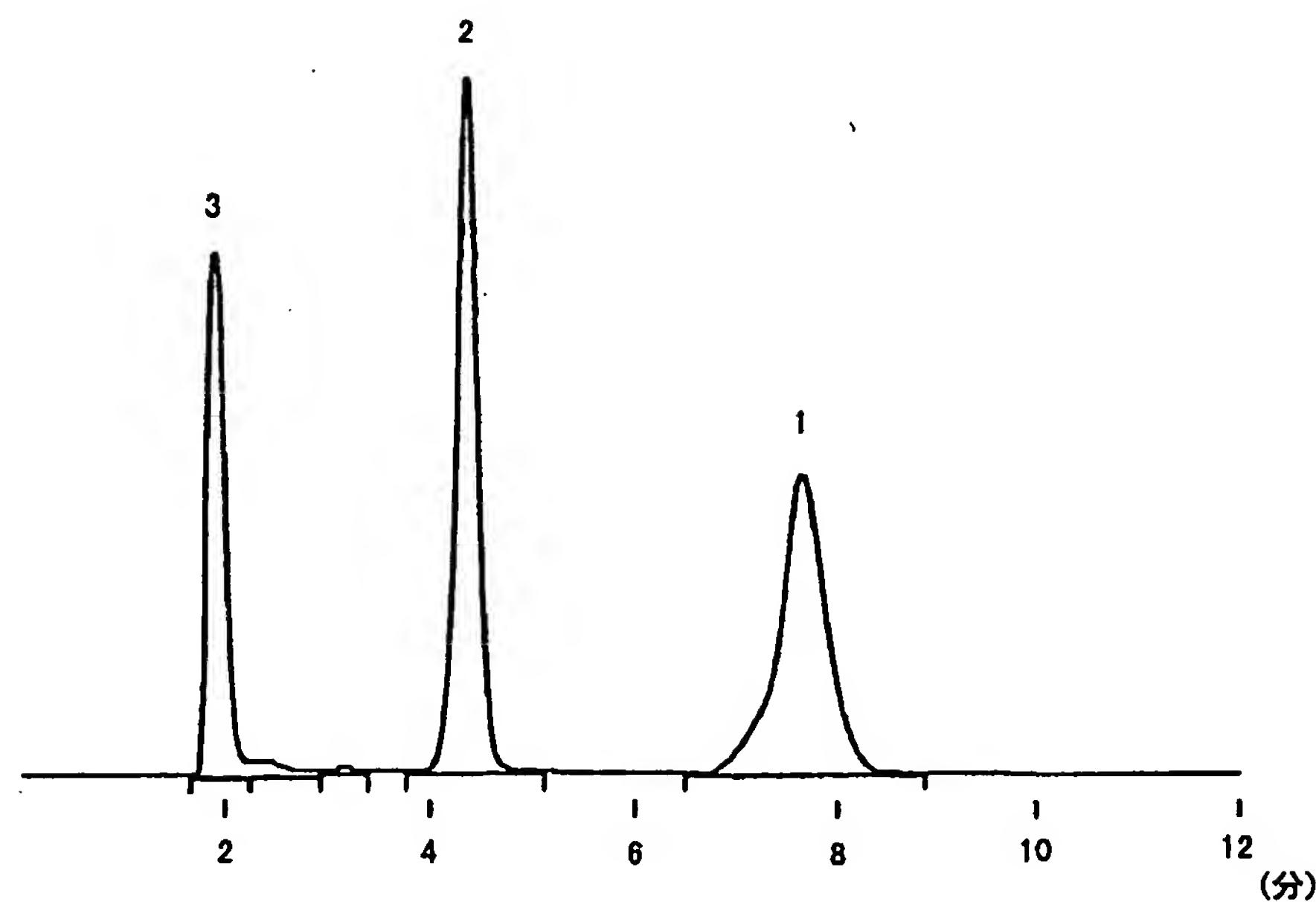


第2図

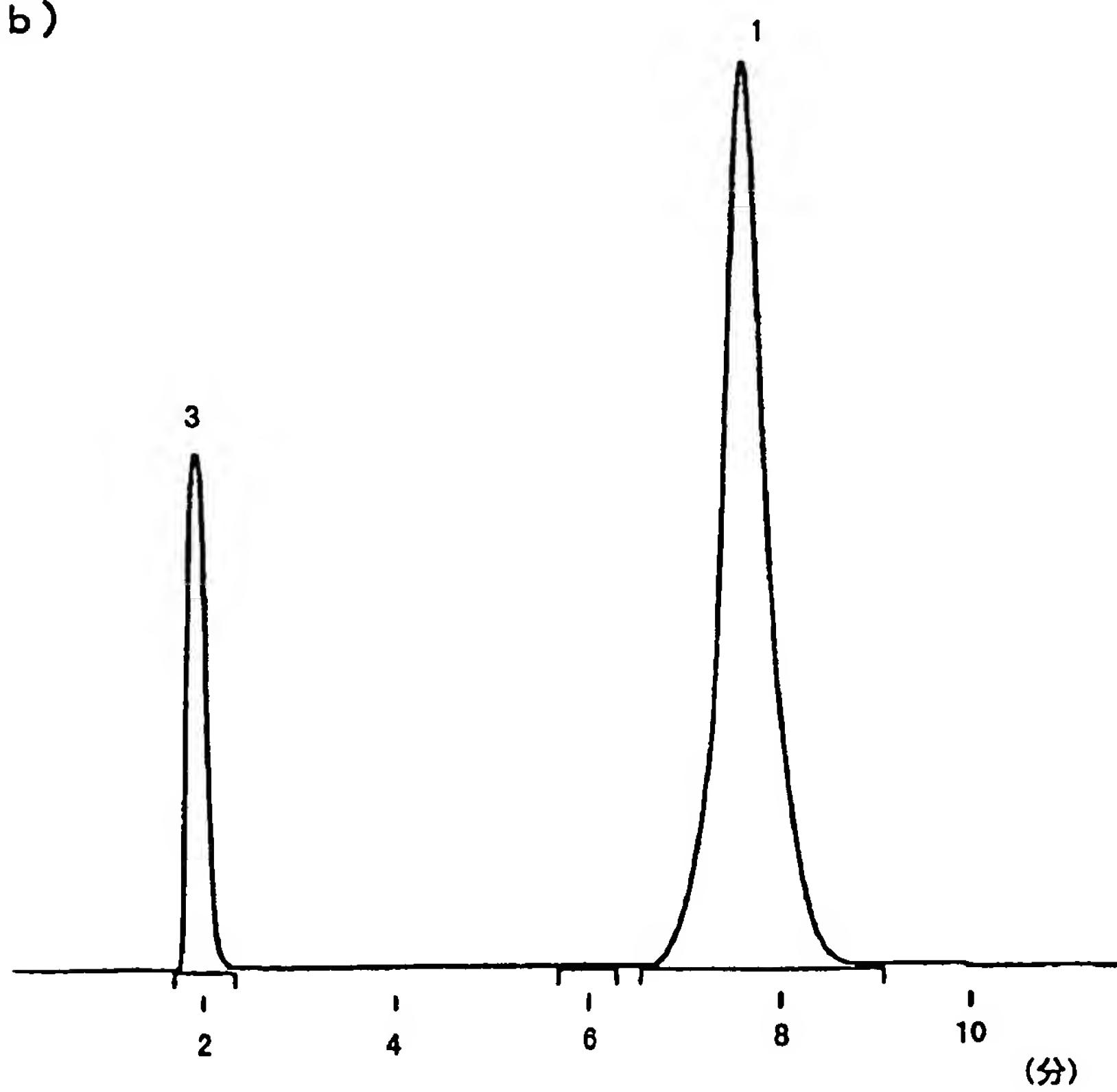


第3図

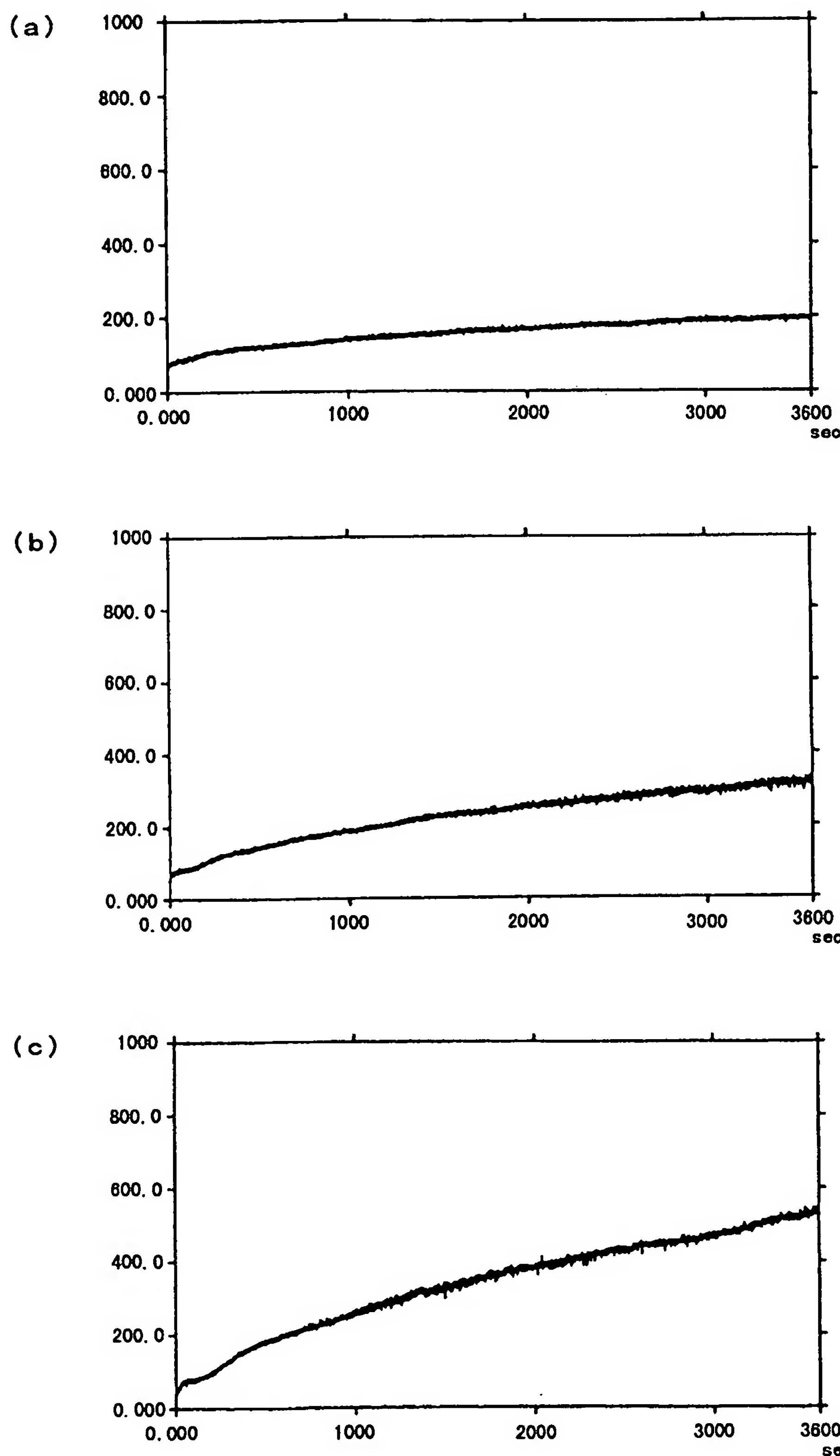
(a)



(b)



第4図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/01658

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl ⁶ C07D311/82, C07D493/08, C07D493/10, C07D493/22, G01N33/48, G01N21/78 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl ⁶ C07D311/00-82, C07D493/00-22, G01N33/00-48, G01N21/00-78		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) REGISTREY (STN), CAPLUS (STN), WPIDS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 3-500817, A (RADIOMETER A/S), 21 February, 1991 (21. 02. 91) & WO, 89/04476, A1 & EP, 386072, A1 & US, 5242835, A	1-11
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 22 June, 1999 (22. 06. 99)		Date of mailing of the international search report 6 July, 1999 (06. 07. 99)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP99/01658

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. Cl. C07D311/82, C07D493/08, C07D493/10, C07D493/22, G01N33/48, G01N21/78

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. Cl. C07D311/00-82, C07D493/00-22, G01N33/00-48, G01N21/00-78

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

REGISTREY(STN), CAPLUS(STN), WPIDS(STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 3-500817, A (RADIOMETER A/S) 21. 2月. 1991 (21. 02. 91) &WO, 89/04476, A1 &EP, 386072, A1 &US, 5242835, A	1-11

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 22. 06. 99	国際調査報告の発送日 06.07.99
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 齋藤 恵 印 4P 9164 電話番号 03-3581-1101 内線 3490